



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**IDENTIFICAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE ESPÉCIES DE  
*Pratylenchus* EM CANA-DE-AÇÚCAR NO ESTADO DE SÃO  
PAULO, BRASIL**

**THALISSON ROSA DE ARAUJO**

**Brasília-DF**

**2024**

**THALISSON ROSA DE ARAUJO**

**IDENTIFICAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Pratylenchus* EM  
CANA-DE-AÇÚCAR NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

**Orientadora:** Profa. Thaís Ribeiro Santiago

## FICHA CATALOGRÁFICA

*Aos meus pais, João e Maria, por todo amor,  
dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus pela fidelidade, pois até aqui me ajudou o Senhor.

Aos meus pais e irmãos pelos ensinamentos, apoio, carinho e compreensão em momentos de ausência.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório pelos momentos e risadas, os quais sempre levarei. Em especial a Leila, Bruno, Francisco, Jefferson, Santiago, Vitório, João, Kelvin, Giuliana, Matheus e Larissa, pelo companheirismo e auxílio em diversas etapas da realização do meu trabalho.

À Dra. Thaís, pela orientação, paciência, amizade e apoio em todo o período do mestrado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da UnB que contribuíram para minha formação. À Universidade de Brasília pela oportunidade.

À banca examinadora, Dr. Cristiano, Dr. Cláudio e Dr. Cléber, por aceitarem este convite.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos concedidos e pela bolsa de mestrado.

A todos os demais envolvidos que contribuíram para este momento.

Trabalho realizado no Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Profa. Thaís Ribeiro Santiago, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**IDENTIFICAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Pratylenchus* EM CANA-DE-AÇÚCAR NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

**THALISSON ROSA DE ARAUJO**

DISSERTAÇÃO APROVADA em \_\_/\_\_/\_\_ por:

---

Dr. Cristiano Bellé  
(Examinador Externo)

---

Dr. Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira  
(Examinador Externo)

---

Profa. Thaís Ribeiro Santiago  
Universidade de Brasília (Orientadora)

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABELA.....	5
INTRODUÇÃO.....	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
<i>Amostragem.....</i>	16
<i>Multiplicação dos nematoides parasitas de plantas em casa de vegetação.....</i>	17
<i>Extração e purificação de nematoides.....</i>	17
<i>Obtenção das populações puras.....</i>	17
<i>Avaliação morfológica das populações puras.....</i>	18
<i>Extração de DNA e identificação molecular.....</i>	19
<i>Análise filogenética.....</i>	19
RESULTADO.....	20
<i>Presença de dois morfotipos na população de <i>Pratylenchus</i> no estado de São Paulo em amostras de campo.....</i>	21
<i>Detecção da presença de <i>P. brachyurus</i> e <i>P. zeae</i> utilizando primer espécie-específico.....</i>	22
<i>Análise morfológica das populações puras.....</i>	23
<i>Análise filogenética confirma a ocorrência de <i>P. zeae</i> e <i>P. brachyurus</i> em cana-de-açúcar.....</i>	24
DISCUSSÃO.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
TABELAS.....	41
FIGURAS.....	45

## RESUMO GERAL

ARAÚJO, Thalisson Rosa de. **Identificação morfo-molecular de espécies de *Pratylenchus* em cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil.** 2024. 50p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura agrícola fundamental no Brasil, especialmente no estado de São Paulo, principal produtor nacional. No entanto, fitonematoides como *Pratylenchus*, reduzem a produtividade ao causarem lesões radiculares. Este estudo aplicou taxonomia integrativa para identificar e mapear as espécies de *Pratylenchus*, em áreas de cultivo de cana-de-açúcar em São Paulo. Foram coletadas 33 amostras de solo e raízes em 23 municípios do estado. A identificação dos nematoides foi realizada por meio de análises morfológicas, morfométricas e moleculares. As variáveis morfométricas avaliadas incluíram: comprimento do corpo (L), comprimento do estilete (ST), diâmetro e altura dos bulbos do estilete ( $\emptyset$ STB e STB), comprimento da cauda (T), comprimento do esôfago (ESO), distância da vulva até o ânus (VA), diâmetros do corpo nas regiões anterior e da vulva ( $\emptyset$ LAN e  $\emptyset$ LVU), comprimento da sobreposição (EG), distância da extremidade anterior até a vulva (V), e relações métricas como a (L/menor largura do corpo), b (L/ESO), c (L/T) e V% ( $(V/L) \times 100$ ). Nas análises moleculares, foram utilizados primers espécie-específicos e o sequenciamento das regiões D2-D3 do rDNA 28S, 18S/26S do espaçador transcrito interno (ITS) e do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI). As análises revelaram a presença de duas espécies de *Pratylenchus*. *Pratylenchus zae*, foi encontrado em todas as amostras, enquanto populações mistas com *Pratylenchus brachyurus*, foram observadas nos municípios de Guaianás, Itaí, Ituverava, Jales, Orlandia, Rancheira, Santo Antônio do Aracanguá e Santópolis do Aguapeí. A análise morfológica e morfométrica evidenciou diferenças significativas entre *P. zae* e *P. brachyurus*, com os seguintes dados médios, respectivamente: L (509,9  $\mu$ m; 607,2  $\mu$ m), T (27,4  $\mu$ m; 29,6  $\mu$ m), ESO (85,5  $\mu$ m; 110,8  $\mu$ m), ST (15,2  $\mu$ m; 18,3  $\mu$ m), STB (2,3  $\mu$ m; 3,20  $\mu$ m),  $\emptyset$ STB (4,2  $\mu$ m; 5,0  $\mu$ m), VA (120,4  $\mu$ m; 64,6  $\mu$ m),  $\emptyset$ LAN (21,3  $\mu$ m; 24,1  $\mu$ m),  $\emptyset$ LVU (24,4  $\mu$ m; 21,9  $\mu$ m), V (363,9  $\mu$ m; 515,0  $\mu$ m), V% (71,4%; 84,8%), EG (30,1  $\mu$ m; 43,8  $\mu$ m), a (24,3; 25,2), b (6,0; 5,5) e c (18,7; 20,9), respectivamente. Além disso, a amplificação com primers específicos e a análise filogenética confirmaram a identificação das espécies. Este estudo reforça a importância das técnicas moleculares como complemento às metodologias clássicas, promovendo uma identificação precisa das espécies. Essa precisão é essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo integradas e eficazes, além de possibilitar a detecção precoce e o monitoramento de novas espécies que possam emergir na agricultura.

**Palavra-chave:** *Pratylenchus zaeae*, *Pratylenchus brachyurus*, taxonomia integrativa, *Saccharum hybridum*, co-infecção, 28S, ITS e COI.

### GENERAL ABSTRACT

ARAÚJO, Thalisson Rosa de. **Morpho-molecular identification of *Pratylenchus* species in sugarcane in the state of São Paulo, Brazil.** 2024. 50p. Dissertation (Master's Degree in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is a key agricultural crop in Brazil, particularly in São Paulo state, the country's leading producer. However, plant-parasitic nematodes, such as *Pratylenchus* species, reduce productivity by causing root lesions. This study applied integrative taxonomy to identify and map *Pratylenchus* species in sugarcane-growing areas in São Paulo. Thirty-three soil and root samples were collected across 23 municipalities in the state. Nematode identification involved morphological, morphometric, and molecular analyses. Morphometric variables evaluated included: body length (L), stylet length (ST), stylet bulb diameter and height ( $\emptyset$ STB and STB), tail length (T), esophagus length (ESO), vulva-to-anus distance (VA), body diameters in the anterior and vulval regions ( $\emptyset$ LAN and  $\emptyset$ LVU), overlap length (EG), distance from the anterior end to the vulva (V), and metric ratios such as a (L/max body width), b (L/ESO), c (L/T), and V% ( $(V/L) \times 100$ ). Molecular analyses used species-specific primers and sequencing of the D2-D3 region of 28S rDNA, the 18S/26S internal transcribed spacer (ITS), and the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene. The analyses revealed the presence of two *Pratylenchus* species. *Pratylenchus zaeae* was found in all samples, while mixed populations with *Pratylenchus brachyurus* were observed in the municipalities of Guaianás, Itaí, Ituverava, Jales, Orândia, Rancharia, Santo Antônio do Aracanguá and Santópolis do Aguapeí. Morphological and morphometric analyses indicated significant differences between *P. zaeae* and *P. brachyurus*, with average values as follows: L (509.9  $\mu$ m; 607.2  $\mu$ m), T (27.4  $\mu$ m; 29.6  $\mu$ m), ESO (85.5  $\mu$ m; 110.8  $\mu$ m), ST (15.2  $\mu$ m; 18.3  $\mu$ m), STB (2.3  $\mu$ m; 3.20  $\mu$ m),  $\emptyset$ STB (4.2  $\mu$ m; 5.0  $\mu$ m), VA (120.4  $\mu$ m; 64.6  $\mu$ m),  $\emptyset$ LAN (21.3  $\mu$ m; 24.1  $\mu$ m),  $\emptyset$ LVU (24.4  $\mu$ m; 21.9  $\mu$ m), V (363.9  $\mu$ m; 515.0  $\mu$ m), V% (71.4%; 84.8%), EG (30.1  $\mu$ m; 43.8  $\mu$ m), a (24.3; 25.2), b (6.0; 5.5), and c (18.7; 20.9), respectively. Additionally, specific primer amplification and phylogenetic analysis confirmed species identification. This study emphasizes the importance of molecular techniques as a complement to classical methods, enabling precise species identification. Such precision is essential for developing effective, integrated management strategies and facilitating early detection and monitoring of new species that may emerge in agriculture.

**Keywords:** *Pratylenchus zaeae*, *Pratylenchus brachyurus*, integrative taxonomy, *Saccharum hybridum*, co-infection, 28S, ITS, and COI.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mapa do Brasil destacando o estado de São Paulo, ilustrando a distribuição dos pontos de coleta de acordo com suas coordenadas geográficas. Os pontos em vermelho representam as populações mistas encontradas.....45
- Figura 2 Imagens de microscopia óptica de (A-F) *Pratylenchus zae* e (G-L) *Pratylenchus brachyurus* encontrados em cana de açúcar no estado de São Paulo, Brasil.....46
- Figura 3 Biplot obtido a partir de dados morfológicos e morfométricos de populações de *Pratylenchus* coletados em campos comerciais de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil, submetidas à análise de componentes principais - PCA.....47
- Figura 4 Relações filogenéticas dentro do gênero *Pratylenchus* conforme inferido pela análise bayesiana a partir do D2-D3 das sequências do gene 28S usando o modelo evolutivo GTR+I+G. Sequências recém obtidas estão destacadas em negrito.....48
- Figura 5 Relações filogenéticas dentro do gênero *Pratylenchus* conforme inferido pela análise bayesiana a partir das sequências do gene COI usando o modelo evolutivo GTR+I+G. Sequências recém obtidas estão destacadas em negrito.....49
- Figura 6 Relações filogenéticas dentro do gênero *Pratylenchus* conforme inferido pela análise bayesiana a partir das sequências do gene ITS usando o modelo evolutivo GTR+I+G. Sequências recém obtidas estão destacadas em negrito.....50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número total de amostras, suas respectivas identificações, e os municípios que compõem as áreas amostradas no estado de São Paulo, Brasil.....	41
Tabela 2	Iniciadores espécie-específico utilizados na reação em cadeia da polimerase para identificação molecular de espécies do gênero <i>Pratylenchus</i> em campos de cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil.....	42
Tabela 3	Iniciadores universais utilizados na reação em cadeia da polimerase para amplificação e sequenciamento das regiões 28S, COI e ITS de espécies de <i>Pratylenchus</i> em áreas de cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil.....	42
Tabela 4	Número total de amostras, identificação dos municípios que compõem as áreas amostradas no estado de São Paulo, Brasil, e os resultados positivos e negativos da detecção utilizando primer espécie-específico.....	43
Tabela 5	Valores morfométricos consolidados de todos os espécimes mensurados, conforme a população e a região amostrada, demonstrando todas as variáveis analisadas, apresentadas no formato de médias com desvio padrão.....	44

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum hybridum*) é uma das principais culturas agrícolas globais, sendo a principal fonte de matéria-prima para a produção de açúcar e etanol (CONAB, 2024). Em 2023, a produção mundial atingiu 1,9 bilhões de toneladas, sendo cultivada em aproximadamente 26 milhões de hectares (FAO, 2022). No Brasil, a safra 2023/24 gerou 713,1 milhões de toneladas, mantendo o país como o maior produtor mundial, seguido por Índia e China (FAO, 2022; CONAB, 2024). Dentre as regiões brasileiras, o Sudeste concentra a maior parte dessa produção, com destaque para o estado de São Paulo, responsável por mais de 383 milhões de toneladas/ano (IBGE, 2022; CONAB, 2024).

O rendimento da cana-de-açúcar está relacionado ao número, comprimento e diâmetro dos colmos, enquanto a produção de sacarose depende diretamente do seu teor na planta (Pankhurst et al., 2005). Esse volume de produção poderia ser ainda maior se a cultura não fosse impactada por diversos parasitas, especialmente por nematoides, organismos do Filo Nematoda, que causam danos no sistema radicular e comprometem severamente a produtividade agrícola (Berry et al., 2011; Nicol et al., 2011). Os nematoides associados a cana-de-açúcar apresentam uma diversidade superior à encontrada na maioria das demais culturas agrícolas (Wang et al., 2015). Mais de 310 espécies, pertencentes a 48 gêneros, foram identificadas em raízes ou na rizosfera da cana-de-açúcar (Cadet e Spaul, 2005). No cultivo dessa cultura, as perdas provocadas por fitonematoides podem variar de 20% a 40%, dependendo das espécies presentes, dos níveis populacionais e da suscetibilidade das variedades cultivadas (Dinardo-Miranda, 2005; Noronha et al., 2017; Bellé et al., 2017).

Os principais nematoides parasitas da cana-de-açúcar pertencem à ordem Tylenchida, com destaque para o gênero *Pratylenchus*, conhecido como nematoides-das-lesões-radiculares. Esse grupo é o terceiro de maior importância econômica mundial e um dos nematoides parasitas de plantas mais comuns que infectam a cana-de-açúcar (Castilho e Vovlas, 2007; Jones et al., 2013). Levantamentos nematológicos realizados em diferentes regiões produtoras ao redor do mundo detectaram a presença de pelo menos 11 espécies de *Pratylenchus* em áreas comerciais de cana-de-açúcar, incluindo *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev

& Schuurmans Stekhoven, 1941, *P. pratensis* (de Man, 1880) Filipjev, 1936, *P. bhattii* Siddiqi, Dabur & Bajaj, 1991, *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, *P. delattrei* Luc, 1958, *P. mulchandi* Nandakumar & Khera, 1970, *P. scribneri* Steiner in Sherbakoff & Stanley, 1943, *P. sudanensis* Loof & Yassin, 1971, *P. thornei* Sher & Allen, 1953, *P. zaeae* Graham, 1951 (Castillo e Vovlas 2007), e mais recentemente *P. parazeae* Wang, Zhuo, Ye & Liao, 2015. Entre essas espécies, *P. zaeae* destacam-se por ser frequentemente encontradas nas principais regiões produtoras, e por estarem associadas às maiores perdas nessa cultura em âmbito global. Além disso, *P. zaeae* é considerado altamente agressivo a cana-de-açúcar (Cadet e Spaul, 2005).

Devido à baixa prevalência das demais espécies, pouco se sabe sobre seu real impacto na cultura da cana-de-açúcar (Bhuiyan et al., 2024). Estudos realizados nas principais regiões produtoras da África do Sul e Austrália confirmaram a presença de *P. zaeae* (Berry et al., 2008, 2017; Bhuiyan et al., 2021). Na China, além da identificação de *P. zaeae*, associado à cultura, relatou-se a presença de *P. thornei* e, recentemente, descreveu-se a espécie *P. parazeae*, que apresenta grande similaridade morfológica com *P. zaeae*, diferenciando-se apenas a nível molecular (Wang et al., 2015).

No Brasil, os resultados obtidos no Rio Grande do Sul (Bellé et al., 2014), Pernambuco (Cardoso et al., 2015; Maranhão et al., 2018), Alagoas (Noronha et al., 2017), São Paulo (Dinardo-Miranda, 2005) e Paraná (Severino et al., 2010; Martinha et al., 2022), utilizando abordagens morfológicas e morfométricas, corroboram com os achados de outros países, indicando a predominância de *P. zaeae*. *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) foi relatado no Rio Grande do Sul e São Paulo, sendo conhecido por causar danos em diversas culturas (Dinardo-Miranda, 2005; Bellé et al., 2014), embora seja menos frequente na cana-de-açúcar. Quando presente, *P. brachyurus* ocorre sempre em coinfeção com *P. zaeae* (Bellé et al., 2014). No entanto, o número de espécies de *Pratylenchus* impactando a cana-de-açúcar pode ser maior do que o relatado, dado o reduzido número de estudos realizados em relação à área plantada, e a utilização de metodologias clássicas para a identificação.

A identificação tradicional das espécies de *Pratylenchus* baseia-se em características morfológicas e morfométricas observadas por microscopia de luz,

equipamento crucial para a nematologia vegetal (Oliveira et al., 2011b). No entanto, com o aumento do número de espécies descritas, a ausência de caracteres morfológicos e morfométricos distintivos e a plasticidade fenotípica intra e interespecífica dentro do gênero *Pratylenchus* (Subbotin et al., 2008) tornam a identificação precisa de espécies por métodos tradicionais cada vez mais desafiadora e imprecisa (Castillo e Vovlas, 2007; Janssen et al., 2017). Esse desafio é agravado pela necessidade de exemplares adultos bem preservados e pela carência de profissionais altamente especializados.

Diante dessas limitações, a associação de métodos clássicos com técnicas moleculares tem se mostrado promissora para a discriminação de espécies de *Pratylenchus* (Janssen et al., 2017). Técnicas moleculares, como a amplificação de regiões conservadas e análise filogenética de fragmentos ribossomais e mitocondriais, como D2-D3 do rDNA 28S, 18S/26S do espaçador transcrito interno (ITS) e o gene do citocromo oxidase I (COI), têm delineado as relações evolutivas entre diferentes espécies. Assim, a taxonomia integrativa, que combina dados morfológicos, morfométricos e moleculares, é essencial para superar as limitações de uma única fonte de dados, permitindo um entendimento mais preciso da diversidade biológica dessas espécies.

Há uma notável lacuna no levantamento abrangente das espécies de *Pratylenchus* associadas à cana-de-açúcar em importantes regiões produtoras do Brasil. Este estudo, baseado no conceito de taxonomia integrativa, visou identificar a ocorrência e distribuição de espécies de *Pratylenchus* no estado de São Paulo, o principal produtor de cana-de-açúcar do Brasil. Assim, os objetivos do trabalho foram: (i) implementar uma abordagem integrativa para a identificação de espécies de *Pratylenchus*, utilizando técnicas morfológicas, morfométricas e moleculares; e (ii) investigar a presença, incidência, e distribuição de populações mistas de *Pratylenchus* na cana-de-açúcar em São Paulo.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L) é uma monocotiledônea alógama, perene, que realiza fotossíntese por meio do mecanismo C4. A planta pertence à classe Liliopsida, ordem Cyperales, família Poaceae e gênero *Saccharum* L. (Healey

et al., 2024). O gênero *Saccharum* inclui as espécies selvagens *S. spontaneum* Linnaeus ( $2n=40-128$ ) e *S. robustum* Brandes & Jew. ex grassl. ( $2n=60-205$ ), além das espécies cultivadas *S. officinarum* Linnaeus ( $2n=80$ ), *S. barberi* Jeswit ( $2n=81-124$ ), *S. sinensis* Roxb ( $2n=111-120$ ) e *S. edule* Hassk ( $2n=60-80$ ). Diferentemente de outras gramíneas, a cana-de-açúcar acumula em seu colmo reservas de carboidratos na forma de sacarose produzida a partir dos fotoassimilados (Bremer, 1961; Verheye et al., 2010).

Atualmente, as cultivares de cana-de-açúcar são híbridos poliploides (*S. hybridum*), resultantes de cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Healey et al., 2024). Esses híbridos são adaptados e cultivados em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Butterfield et al., 2001), e constituem a maior parte do genoma das variedades modernas (de Moraes et al., 2015; Healey et al., 2024). Acredita-se que *S. spontaneum* seja originária do sudeste asiático, apresentando uma genética altamente polimórfica que confere rusticidade à sua progênie. Em contraste, *S. officinarum*, conhecida como cana nobre, foi domesticada na região da Nova Guiné e é caracterizada pelo alto teor de sacarose em seu colmo, embora seja mais suscetível a pragas e doenças (Amaral et al., 2015; de Moraes et al., 2015). Acredita-se que sua domesticação remonta a 8000 a.C., em Papua Nova Guiné, para consumo humano e animal, e posteriormente se espalhou para a Índia, China e Pérsia (Daniels e Roach, 1987; Dinesh Babu et al., 2022). Por volta de 600 d.C., a cana-de-açúcar foi disseminada pelo Oriente Médio, África e Espanha pelos árabes que a descobriram na Pérsia (Bhuiyan et al., 2024).

A atividade humana foi crucial para a disseminação da cana-de-açúcar entre os continentes, sendo introduzida nas Américas no século XV, durante as grandes navegações de Cristóvão Colombo, chegando primeiramente à região de Santo Domingo, na atual República Dominicana (Evans e Joshi, 2016). Atualmente, a cana-de-açúcar é uma cultura agrícola de grande relevância econômica e social em cerca de 137 países tropicais e subtropicais (Bhuiyan et al., 2024). Seu cultivo é favorecido pela capacidade de acumular altos teores de sacarose em seus colmos, sendo a fonte de matéria-prima para 80% do açúcar mundial, além de atender à crescente demanda por biocombustíveis, com a produção de etanol em escala mundial, tornando-se ainda mais relevante (Bordonal et al., 2018; CONAB, 2024). Além disso, seus subprodutos

são usados na alimentação animal, produção de fertilizantes orgânicos, bebidas alcoólicas e não alcoólicas, bioplástico, celulose, carvão ativado e biochar (García-Bustamante et al., 2018).

Segundo a FAO (2022), a produção mundial de cana-de-açúcar foi de 1,9 bilhões de toneladas, cultivada em uma área de aproximadamente 26 milhões de ha, distribuída nas Américas (50,6%), Ásia (42,7%), África (5,1%) e Oceania (1,6%). O Brasil é o maior produtor e exportador dessa commodity, com 37,7% da produção global, seguido pela Índia (22,8%), China (5,37%), Tailândia (4,79%) e Paquistão (4,57%). Na safra 2023/24, as exportações brasileiras de açúcar somaram 35,2 milhões de toneladas, gerando uma receita de US\$18,3 bilhões, com os principais destinos sendo China, Índia e Indonésia (CONAB, 2024).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVI, sendo inicialmente cultivada em engenhos nas áreas litorâneas do país. Posteriormente, o cultivo expandiu-se para o interior, visando o comércio açucareiro da época (Rêgo e Hoeflich, 2001; Rodrigues e Ross, 2020). Atualmente, a produção de cana-de-açúcar se estende por todas as macrorregiões brasileiras, em uma área estimada de 8.333,9 mil ha, com um rendimento médio de 85.580 kg/ha. A distribuição regional é de 0,59% no Norte, 8,79% no Nordeste, 21,2% no Centro-Oeste, 5,21% no Sul e 64,2% no Sudeste (IBGE, 2022; CONAB, 2024). Embora o cultivo tenha iniciado no Nordeste, foi o Sudeste que impulsionou o desenvolvimento da indústria sucroalcooleira, concentrando a maior parte da produção nacional. Na safra 2023/24, a região Sudeste produziu aproximadamente 469,026 mil toneladas de cana, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, com 383,409 mil toneladas, o que corresponde a 53,8% da produção nacional (CONAB, 2024).

A propagação convencional dessa cultura é feita de forma vegetativa a partir de segmentos de colmos provenientes de plantas do campo. E sua fisiologia vegetal a torna competitiva em comparação a outras fontes de matéria-prima nos setores sucroalcooleiro e energético devido ao seu cultivo semi-perene, que permite a rebrota após a colheita (Leme Filho, 2023). O novo crescimento das touceiras colhidas dá origem às safras de cana soca. A maioria das cultivares de cana-de-açúcar pode ser cultivada por pelo menos três a quatro safras de soca. Apesar de ser cultivada há mais de 500 anos no Brasil, resultados mais expressivos poderiam ser alcançados se

não fosse pela influência de diversas doenças de origem bióticas causadas por patógenos fitoparasitas de solo (Maranhão et al., 2018). O cultivo contínuo mantém o sistema radicular ativo por vários ciclos, criando um ambiente favorável ao desenvolvimento de fitopatógenos, entre eles, os nematoides parasitas de plantas são os principais fatores limitantes da produtividade.

Os nematoides são animais multicelulares que evoluíram há aproximadamente 1 bilhão de anos, tornando-se um dos animais mais antigos da terra (Wang et al., 1999). Hoje, são amplamente distribuídos por diferentes ambientes e climas ao redor do mundo. São organismos microscópicos semelhantes a vermes que se alimentam de tecido vegetal, afetando principalmente as raízes de suas hospedeiras. Eles suprimem as defesas das plantas e modulam os mecanismos celulares em benefício próprio (Silva et al., 2016; Siddique e Grundler, 2018). O primeiro registro de nematoide em cana-de-açúcar foi provavelmente feito por Treub (1885) na ilha de Java, Indonésia, onde ele identificou a espécie de nematoides-das-galhas, atualmente conhecida como *Meloidogyne javanica* (Holtzmann, 1964; Winchester 1969). Logo depois, Soltwedel e Cobb descreveram o nematoide-das-lesões-radiculares associado à cana-de-açúcar na Indonésia e na Austrália, nomeando a espécie como *Tylenchus sacchari*, posteriormente reclassificada como *Pratylenchus sacchari* (Soltwedel, 1888) Filipjev, 1936 (Holtzmann, 1964). Os campos de cana-de-açúcar abrigam cerca de 310 espécies em 48 gêneros de nematoides parasitas de planta (Cadet e Spaul, 2005; Ramouthar e Bhuiyan, 2018). Entretanto, há também grupos de nematoides não parasitas, conhecidos como nematoides de vida livre, que habitam a rizosfera da cultura (Sánchez-Moreno e Ferris, 2018).

As espécies de nematoides parasitas de plantas se alimentam de tecidos vegetais, como caule, folhas e principalmente raízes. Esses nematoides podem ser subdivididos em dois grupos conforme seu hábito alimentar: ectoparasitas e endoparasitas. Os ectoparasitas alimentam-se das raízes externamente, enquanto que os endoparasitas penetram e consomem o tecido internamente (Siddique e Grundler, 2018). Embora os ectoparasitas sejam comuns na maioria dos tipos de solo, os endoparasitas representam uma ameaça maior à produção de cana-de-açúcar (Bhuiyan et al., 2024). Estima-se que as perdas de produtividade causadas por nematoides variem entre 20% e 40%, dependendo das espécies presentes,

densidade populacional e suscetibilidade da variedade plantada, reduzindo assim a longevidade dos talhões (Dinardo-Miranda, 2005; Noronha et al., 2017; Bellé et al., 2017). Certos gêneros apresentam ampla distribuição geográfica e são frequentemente relatados, como *Pratylenchus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Xiphinema*, *Hoplolaimus*, *Paratrichodorus* e *Trichodorus* (Cadet e Spaul, 2005; Ramouthar e Bhuiyan, 2018). Entre eles, destacam-se as espécies do nematóide-das-galhas *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. enterolobii* (Yang & Eisenback, 1983), *M. ethiopica* Whitehead, 1968, *M. hispanica* Hirschmann, 1986 e *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996, e das-lesões-radiculares *P. zae* e *P. brachyurus*, sendo o último grupo o mais abundante e importante para a cana-de-açúcar (Cadet e Spaul, 2005; Oliveira et al., 2019; Bhuiyan et al., 2022).

A distinção do gênero *Pratylenchus*, de modo geral, é relativamente simples, para diagnose de rotina, pois se baseia na morfologia de fêmeas adultas, que apresentam mais caracteres diagnósticos do que os machos, os quais podem ser raros ou desconhecidos para um número significativo de espécies (Loof, 1991; Castillo e Vovlas, 2007). Todas as espécies do grupo são parasitas obrigatórios, polípagos, endoparasitas migradores, com tamanho microscópico que variam de 0,3 a 0,9 mm de comprimento, com o formato vermiforme, sem dimorfismo sexual. Corpo robusto, recoberto por uma fina cutícula, com estriação transversal delicada (Ferraz, 1999). A região cefálica rígida e fortemente esclerotizada, representa uma adaptação em sua morfologia para adequar-se ao seu comportamento endoparasitário que penetra e se alimenta de células vegetais (Castillo e Vovlas, 2007). Possuem um estômato estilete curto e robusto, com nódulos basais bem desenvolvidos e formatos que podem variar consideravelmente. O esôfago é tilencoide, com glândulas esofagianas sobrepondo ventralmente a porção inicial do intestino. Além disso, a posição relativa do sistema reprodutor feminino é muito útil na separação entre várias espécies, com a vulva situada no terço posterior do corpo (Troccoli et al., 2016; Ferraz e Brown, 2016). O sistema reprodutor feminino é composto por ovário, oviduto, útero, vagina e vulva, em algumas espécies, há uma estrutura chamada espermateca, que armazena espermatozoides e está situada na porção terminal do ovário ou entre o oviduto e o útero (Ferraz e Brown, 2016; Castillo e Vovlas, 2007).

Embora *Pratylenchus*, parasite uma ampla gama de espécies vegetais nativas e culturas agrícolas, há uma clara preferência por certos hospedeiros (Goulart, 2008). Esses nematoides estão amplamente disseminados no solo em diversos continentes (Siddiqi et al., 2000; Castilho e Vovlas, 2007), e nem sempre as infestações no campo apresentam sintomas evidentes. Esses nematoides penetram nas raízes das plantas pela epiderme e migram para camadas mais profundas do córtex, em direção ao cilindro central. Essa migração, que ocorre de forma inter e intracelular, é facilitada pela ação mecânica do estilete e pela liberação de enzimas e toxinas das glândulas esofagianas, que degradam as paredes celulares. Esse processo não só facilita a penetração, mas também causa danos significativos ao consumir o conteúdo das células vegetais. Além dos danos diretos causados no tecido parasitado, que pode variar bastante, resultando em lesões necróticas visíveis, redução do sistema radicular e crescimento mais superficial, prejudicando a absorção de nutrientes e provocando sintomas reflexos na parte aérea como clorose, murcha, especialmente em períodos de seca, nanismo, além de atraso no desenvolvimento e queda na produtividade (Jones e Fosu-Nyarko, 2014). O que pode ser atribuído apenas a deficiência nutricional ou manejo inadequado.

O ciclo de vida dos *Pratylenchus* é simples e relativamente rápido, variando de 3 a 8 semanas, dependendo da espécie e de fatores ambientais como temperatura e umidade. O ciclo compreende seis estágios de desenvolvimento: ovo, quatro estágios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e a forma adulto. As fêmeas depositam seus ovos no interior das raízes hospedeiras ou no solo próximo às raízes. O primeiro estágio juvenil (J1) ocorre ainda dentro do ovo, eclodindo como J2. Após a eclosão, os juvenis (J2 a J4) passam por mudas até atingirem a fase adulta. Cada fêmea pode depositar de 70 a 120 ovos durante seu ciclo. Todos os estágios móveis são infectantes e podem migrar e penetrar nas raízes da planta ao longo de toda a vida (Ferraz, 1999).

Dentro do gênero *Pratylenchus*, a reprodução pode ser anfimítica (*P. penetrans*; *P. coffeae*, por exemplo) ou partenogenética meiótica (*P. scribneri*) ou mitótica (*P. zae*; *P. brachyurus*) (Ferraz, 1999). A reprodução anfimítica envolve a cópula entre macho e fêmea, aumentando a diversidade genética das gerações futuras. Na partenogênese, não há fertilização cruzada, dispensando a presença de machos, e subdivide-se em meiótica e mitótica, sendo comum entre fitonematoides

de importância agrícola (Ferraz e Brown, 2016; Castilho e Vovlas, 2007). Em decorrência do tipo de reprodução das fêmeas, os machos podem ser presentes ou raros (Ferraz, 1999). A capacidade dessas espécies de parasitar uma grande diversidade de hospedeiros torna o parasitismo de *Pratylenchus* menos especializado quando comparado a outros fitonematoides como *Heterodera* e *Meloidogyne* (Castilho e Vovlas, 2007). Essa natureza polífaga permite que parasitem diversas culturas agrícolas perenes, semi perenes ou anuais, como algodão, amendoim, arroz, batata, café, cana-de-açúcar, cereais, milho, soja, trigo, ornamentais, frutíferas, forrageiras e plantas daninhas.

A primeira espécie do gênero descrita foi *Tylenchus pratensis* de Man (1880), posteriormente reclassificada por Filipjev como *Pratylenchus pratensis* (de Man, 1880) Filipjev, 1936, estabelecendo o gênero *Pratylenchus* (Ferraz, 1999; Castilho e Vovlas, 2007). Atualmente, são reconhecidas cerca de 103 espécies no gênero (Nguyen et al., 2019). No Brasil, algumas das espécies relatadas incluem *P. pseudofallax* Café-Filho & Huang, 1989, *P. jaehni* Inserra et al., 2001, ambas endêmicas, além de *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. crenatus* Loof, 1960, *P. jordanensis*, *P. neglectus* (Rensch, 1924), *P. penetrans* (Cobb, 1917), *P. scribneri* Steiner, *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951, e *P. zae* (Ferraz e Brown, 2016). Apesar desse número significativo de espécies no Brasil, estudos anteriores relataram a ocorrência de apenas *P. brachyurus* e *P. zae* na cultura de cana-de-açúcar.

O crescente número de espécies descritas no gênero *Pratylenchus* torna a identificação morfológica imprecisa, devido à limitação de caracteres taxonômicos, alta variabilidade intraespecífica e semelhança morfológica, como o número de anéis labiais, formato da cauda e medidas morfométricas sobrepostas, como comprimento da sobreposição das glândulas esofágicas e comprimento do saco pós-uterino (Castillo e Vovlas, 2007; Oliveira et al., 2011a; Janssen et al., 2017). Estudos recentes identificaram diferentes morfotipos dentro de uma única espécie, o que complica ainda mais a identificação precisa apenas com base na morfologia (Triccoli et al., 2016). Diante dessas limitações, a comparação de similaridades genéticas tem incentivado a adoção de técnicas moleculares como uma alternativa eficaz para complementar a identificação morfológica desses patógenos (Oliveira et al., 2011b).

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, como a PCR, foram desenvolvidas para uso na nematologia, possibilitando a identificação de espécies independentemente do estágio de vida ou das semelhanças morfológicas. Essas técnicas oferecem alta sensibilidade, precisão e confiabilidade, sendo especialmente eficazes para complementar informações descritivas (Oliveira et al., 2011a). Quando usadas em conjunto com métodos convencionais, elas proporcionam um diagnóstico ainda mais robusto e podem ser usadas para revelar novas relações evolutivas entre espécies (Oliveira et al., 2011a; van Megen et al., 2009). A demonstração de que um método baseado em PCR poderia amplificar regiões polimórficas capazes de diferenciar espécies intimamente relacionadas de nematoides representou um avanço significativo (Powers e Harris, 1993). Subsequentemente, estudos seguiram validando esse princípio para diversos gêneros, como *Xiphinema* (Oliveira et al., 2005), *Heterodera* (Subbotin et al., 2000), *Meloidogyne* (Zijlstra, 2000) e *Pratylenchus* (Subbotin et al., 2008; Janssen et al., 2017). Desde então, a revolução trazida pelo PCR nas últimas décadas resultou em um fluxo contínuo de publicações que exploram uma ampla gama de aplicações.

Dentre os métodos moleculares, a amplificação de DNA com primers espécie-específicos, tem se mostrado promissora na identificação de *Pratylenchus*, permitindo a detecção de forma confiável da espécie alvo, mesmo em amostras mínimas e geograficamente distintas (Machado et al., 2007). Esses primers são desenhados com base em sequências específicas, geralmente nas regiões 18S (Subbotin et al., 2008; van Megen et al., 2009), 28S (Al-Banna et al., 2004; Handoo et al., 2001; Subbotin et al., 2008) e ITS do rDNA (De Luca et al., 2011; Wang et al., 2012). A detecção de espécies de *Pratylenchus* por PCR com primers específicos é baseada na detecção direta dos produtos gerados com tamanhos conhecidos ou na presença de produtos específicos para cada espécie (Berry et al., 2008), exigindo apenas uma eletroforese em gel de agarose após a amplificação do DNA. Além disso, conjuntos de primers específicos constituem ferramentas práticas e rápidas para diagnóstico, sendo úteis para grandes volumes de amostras (Machado et al., 2007). Vários primers específicos foram desenvolvidos para identificar espécies como *P. loosi*, *P. coffeae* (Uehara et al., 1998), *P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. scribneri*, *P. thornei* e *P. vulnus* (Al-Banna et al., 2004), baseados na região D3 do rDNA 26S, para *P. brachyurus* (Machado et al., 2007) e *P. zae* (Uehara et al., 1999), utilizando a região ITS-1.

Outra abordagem molecular é a análise filogenética através do sequenciamento de fragmentos ribossomais e mitocondriais, como as regiões D2-D3 do rDNA 28S (De Ley et al., 1999; Subbotin et al., 2006), do 18S/26S do ITS do rDNA (Vrain et al., 1992) e do citocromo oxidase I (COI) do mtDNA (Derycke et al., 2010). Essas análises elucidam as relações evolutivas entre diferentes espécies e populações. As sequências do 28S e 18S são altamente conservadas e úteis para comparações entre táxons mais distantes, enquanto as regiões ITS, de evolução mais rápida, são úteis para diferenciar espécies intimamente relacionadas (Jones e Fosun-Nyarko, 2014). O gene COI do genoma mitocondrial tem sido amplamente explorado como um marcador confiável, capaz de identificar com alta precisão espécimes desconhecidos (Masters et al., 2011; Janssen et al., 2017).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Amostragem***

Foram coletadas 33 amostras em áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, abrangendo 23 municípios: Américo Brasiliense (2 amostras), Avaré (1), Barretos (4), Bebedouro (1), Boa Esperança do Sul (1), Guaianás (3), Guaíra (2), Itaí (1), Itupeva (1), Jaboticabal (1), Jales (2), Miguelópolis (1), Orlandia (1), Ourinhos (1), Ouroeste (1), Pratânia (1), Rancharia (2), Ribeirão Preto (2), Santa Lúcia (1), Santo Antônio do Aracanguá (1), Santópolis do Aguapeí (1), São Manuel (1) e Taciba (1) (**Figura 1 e Tabela 1**).

A seleção dos locais de coleta foi baseada nas regiões de maior relevância para a produção de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Utilizaram-se como referência dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), visando garantir a representatividade das áreas de cultivo do estado. O deslocamento foi realizado em veículo automotor, em áreas com vias de acesso. Todas as amostras foram coletadas pelos alunos Thálisson Rosa de Araujo e Francisco de Assis dos Santos Diniz. Durante a escolha dos pontos de coleta, adotaram-se critérios visuais, como a presença de plantas atrofiadas, folhas cloróticas, áreas com reboleira e raízes com sintomas de doenças. Cada amostra foi coletada na região da rizosfera das plantas, compreendendo solo e raízes, a uma profundidade de ~20 cm, e o ponto de coleta foi

georreferenciado. As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno, identificadas e armazenadas em caixa térmica até o transporte para o Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.

### ***Multiplicação dos nematoides parasitas de plantas em casa de vegetação***

As amostras coletadas foram mantidas na casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília. O solo das amostras foi destorroado, e as raízes de cana-de-açúcar foram fragmentadas. Em seguida, foi adicionado solo autoclavado, preparado na proporção de 1:1:1 (latossolo vermelho, areia lavada de granulometria média e substrato Bioplant®). Toda a mistura (solo coletado + solo autoclavado) foi acondicionada em sacos de polietileno (11 x 23 x 0,1 cm), adequados para a produção de mudas.

Para todas as amostras, optou-se pelo plantio de mudas de milho (*Zea mays* cv. SEMPRE® 20A44 VIP3) como hospedeiro alternativo padrão. O milho, por ser uma gramínea suscetível ao parasitismo de várias espécies de *Pratylenchus*, facilitou a multiplicação desses nematoides em ambiente controlado. As amostras foram mantidas a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  por aproximadamente três meses. O manejo incluiu apenas adubação foliar com fertilizante líquido NPK 10-10-10 (Dimy®), aplicada conforme a dose recomendada (10 mL/L) a cada 30 dias.

### ***Extração e purificação de nematoides***

Após três meses, as raízes de milho foram cuidadosamente coletadas, lavadas para remover o excesso de solo, e os nematoides foram extraídos do tecido vegetal seguindo a metodologia de Jenkins (1964), modificada por Coolen e D'Herde (1972). O método incluiu trituração das raízes e flutuação centrífuga em solução de sacarose com caulim. As raízes foram cortadas em pedaços de 3 cm, trituradas com água em um liquidificador industrial, e a suspensão foi peneirada através de peneiras de 42, 270 e 500 mesh. Em seguida, a suspensão foi centrifugada para separar os nematoides das impurezas, lavada para remover a sacarose e armazenada a  $4^\circ\text{C}$  até o preparo das populações puras.

### ***Obtenção das populações puras***

A multiplicação *in vitro* dos espécimes de *Pratylenchus* foi realizada em cilindros de cenoura (*Daucus carota* subsp. *sativus*), seguindo a metodologia de Moody et al. (1973), com modificações de Gonzaga et al. (2010). As populações puras foram obtidas a partir de uma única fêmea adulta extraída manualmente utilizando uma agulha curva fina e uma lupa estereoscópica. Em caso de identificação de mais de um morfotipo de fêmea na mesma amostra, estas foram individualmente adicionadas em outro cilindro de cenoura. Os cilindros de cenoura foram inoculados e mantidos em estufas incubadoras (B.O.D.) a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por ~ 90 dias. As populações puras foram extraídas utilizando o método de Coolen & D'Herde (1972) e armazenadas para posterior extração de DNA.

### ***Avaliação morfológica das populações puras***

As análises morfológicas e morfométricas foram realizadas em 10 espécimes adultos de cada amostra e populações puras. Os nematoides foram mortos em banho seco a  $55^\circ\text{C}$  por 10 min e, em seguida, fixados com uma solução GALA (Microscopy U.K., 2002). As lâminas temporárias foram preparadas com 20  $\mu\text{L}$  da suspensão e seladas para análise. A documentação fotográfica foi realizada com um microscópio óptico (Leica, modelo DM 2500) equipado com câmera (Leica, modelo DFC 490). As variáveis morfoanatômicas mensuradas incluíram: comprimento do corpo (L), comprimento do estilete (ST), diâmetro do bulbo do estilete ( $\emptyset\text{STB}$ ), altura dos bulbos do estilete (STB), comprimento da cauda (T), comprimento do esôfago (ESO), distância da vulva até o ânus (VA), diâmetro do corpo na região anterior ( $\emptyset\text{LAN}$ ), diâmetro do corpo na região da vulva ( $\emptyset\text{LVU}$ ), comprimento da sobreposição (EG) e distância da extremidade anterior até a vulva (V). A partir dessas medições, foram calculadas as proporções de De Man: comprimento do corpo/menor largura do corpo (a), (xiii) comprimento do corpo/comprimento do esôfago (b), comprimento do corpo/comprimento da cauda (c) e relação percentual entre a distância da extremidade anterior até a vulva/comprimento total do corpo  $\times 100$  (V%), conforme as abreviaturas definidas por Siddiqi (2000).

Os dados morfométricos foram analisados por componentes principais (PCA) usando a matriz de correlação. A análise foi realizada em duas etapas para selecionar os componentes principais com maior variância e posteriormente formar

agrupamentos. As análises foram realizadas com os pacotes FactoMineR e Factoextra no software R v.4.4.1.

### **Extração de DNA e identificação molecular**

A extração do DNA genômico das populações foi realizada utilizando o método fenol-clorofórmio (Randig et al., 2001), com adaptações para amostras de *Pratylenchus*. A detecção molecular foi conduzida com primers específicos (**Tabela 2**), incluindo iniciadores universais (**Tabela 3**) para *Pratylenchus*. A amplificação por PCR foi realizada em volume de 12,5 µL, contendo 6,25 µL de DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 4,65 µL de água ultrapura estéril, 0,3 µL de oligonucleotídeo iniciadores em uma concentração de 10 ng/µL e 1 µL de DNA em concentrações de 10 a 100 ng/µL. A ciclagem térmica foi conduzida no termociclador ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific), utilizando as condições de PCR descritas nos estudos de referência. Os primers específicos utilizados para cada espécie de *Pratylenchus* foram os seguintes: para *P. vulnus*, utilizaram-se D3B e Pvul (Al-banna et al., 2004); para *P. penetrans*, Ppen-F e D3B (Al-banna et al., 2004); para *P. coffeae*, PC1-F e PC2-R (Uehara et al., 1998); e para *P. jaehni*, Pj1-F e 5818-R (Consoli et al., 2012). Essas são espécies com ocorrência registrada no Brasil. Já *P. parazeae*, PpzF e PpzR, foram utilizados, pois é semelhante ao *P. zaeae* em características morfológicas, tendo sido relatado recentemente na cultura de cana-de-açúcar na China (Wang et al., 2015). O *P. zaeae* (18sF e Praty-R) e *P. brachyurus* (18s-F e ACM7-R) são duas espécies já identificadas associadas à cana-de-açúcar em alguns estados brasileiros, sendo de importância econômica significativa devido às perdas de produtividade que causam (Uehara et al., 1999; Machado et al., 2007; Berry et al., 2008).

### **Análise filogenética**

A amplificação dos fragmentos para confirmação das espécies foi realizada com primers universais para a região D2/D3 do gene 28S, a região mitocondrial COI, e a região ITS (**Tabela 3**) (Vrain et al., 1992; Subbotin et al., 2006). Para todas as reações, a amplificação do DNA genômico foi ajustada para um volume final de 12,5 µL, 6,25 µL de DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 4,65 µL de água ultrapura estéril, 0,3 µL de oligonucleotídeo iniciadores em uma concentração de 10

ng e 1 µL de DNA em concentrações de 10 a 100 ng/µL. As reações ocorreram em um termociclador ProFlex™ (Thermo Fisher Scientific) seguindo a respectiva programação, na ordem citada dos primers: desnaturação inicial a 94 °C por 7 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 60s, anelção a 55 °C por 50s (28s), 54 °C por 1 min (COI) e 61 °C por 2 min (ITS), alongação a 72 °C por 2 min, e uma fase final de extensão de 72°C por 10 min. Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados com a tecnologia Nanopore, no Laboratório de Epidemiologia, Controle e Patologia Florestal do Instituto Biológico, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

As sequências dos genes D2-D3 do 28S, COI e ITS de diferentes espécies de *Pratylenchus*, disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram selecionadas para reconstrução filogenética. *Meloidogyne incognita* foi escolhido como outgroup nos segmentos D2-D3 do 28S e COI com base em análises filogenéticas anteriores para nematoides-das-lesões-radiculares (Troccoli et al., 2016). Para a árvore filogenética do ITS, utilizou-se *Nacobbus aberrans* como outgroup (Wang et al., 2015; Gamboa-Cortés et al., 2023). As sequências obtidas foram alinhadas com o software MEGA v.11 (Tamura et al., 2021), utilizando o algoritmo MUSCLE com parâmetros padrão.

As análises filogenéticas foram conduzidas por inferência bayesiana (IB), empregando o método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) no software MrBayes v3.2.6 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001), executado no CIPRES (Miller et al., 2010). O modelo de evolução de DNA mais adequado para cada região genômica foi determinado pelo MrModeltest v2.3 (Posada e Crandall, 1998), com base no critério de informação de Akaike (AIC). Os parâmetros selecionados pelo AIC, incluindo frequência de bases, proporção de sítios invariáveis, parâmetros da distribuição gama e taxas de substituição, foram aplicados nas análises filogenéticas. As árvores iniciaram aleatoriamente com 10.000.000 gerações, gerando 10.000 árvores, das quais 25% foram descartadas como burn-in. Os valores de probabilidade posterior foram calculados a partir da árvore de consenso maior. As árvores foram visualizadas no FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2016).

## RESULTADO

## ***Presença de dois morfotipos na população de *Pratylenchus* no estado de São Paulo em amostras de campo***

Das 33 áreas estudadas, foi identificada a presença de espécimes do gênero *Pratylenchus* em todos os municípios e amostras coletadas. Os resultados revelaram dois morfotipos distintos nas amostras, inicialmente identificados ao nível de gênero por meio de microscopia de luz. A ausência de machos foi observada em todas as amostras.

O morfotipo 1, predominante em todas as amostras, foi caracterizado por fêmeas com corpo esguio, ligeiramente curvado ventralmente após a morte por calor, região labial não separada do corpo e cutícula anelada. Os nódulos basais do estilete eram largos e achatados na porção superior, em formato de âncora, e o bulbo esofágico sobrepunha ventralmente o intestino. A vulva localizava-se anteriormente comparado com o morfotipo 2, com a abertura mais distante do término da cauda, que era cônica, com terminação variando de pontiaguda a subaguda e sem estrias (**Figura 2A-F**). O morfotipo 2 foi encontrado em duas amostras (UnBPratSP16 e UnBPratSP30), sempre em associação com o morfotipo 1. As fêmeas desse morfotipo apresentavam corpo reto ou ligeiramente curvado ventralmente após a morte por calor, com cutícula anelada. Os nódulos basais do estilete eram robustos e arredondados, em formato de "tulipa", e o bulbo esofágico também sobrepunha ventralmente o intestino. A vulva estava localizada mais posteriormente, próxima ao término da cauda, que era geralmente hemisférica, com terminação lisa ou clavada, apresentando variações (**Figura 2G-L**).

Para uma identificação mais precisa, foram utilizados marcadores moleculares específicos, dada a sua alta sensibilidade comparado aos métodos clássicos e capacidade de detectar isolados das espécies de *Pratylenchus*, inclusive em estágios de ovo e juvenil. Adicionalmente, um indivíduo de cada população de campo, ou mais de um indivíduo no caso da presença de diferentes morfotipos, foi cultivado individualmente em cenoura para a confirmação das espécies. Esta confirmação baseou-se em dados morfométricos de 10 espécimes de cada população e na amplificação do DNA das populações puras, seguida do sequenciamento de três regiões: uma mitocondrial (COI) e duas ribossomais (28S e ITS).

### **Detecção da presença de *P. brachyurus* e *P. zae* utilizando primer espécie-específico**

Cada conjunto de primers específicos foi projetado para amplificar o DNA da espécie-alvo, garantindo a especificidade e evitando a geração de amplicons de outras espécies de *Pratylenchus* (Al-banna et al., 2004). Neste estudo, foram avaliadas a presença das seguintes espécies: *P. vulnus*, *P. penetrans*, *P. coffeae*, *P. jaehni*, *P. parazeae*, *P. zae* e *P. brachyurus*.

Para a detecção de *P. zae*, foi utilizado o conjunto de primers 18sF e Praty-R, que resultou em amplificações positivas em 22 amostras, com o fragmento de DNA amplificado apresentando tamanho de ~250 pb, distribuídas nos seguintes municípios: Américo Brasiliense (UnBPratSP2), Barretos (UnBPratSP4, UnBPratSP5, UnBPratSP6 e UnBPratSP7), Bebedouro (UnBPratSP8), Boa Esperança do Sul (UnBPratSP9), Guaianás (UnBPratSP11 e UnBPratSP12), Itaí (UnBPratSP15), Ituverava (UnBPratSP16), Jaboticabal (UnBPratSP17), Jales (UnBPratSP18 e UnBPratSP19), Orlandia (UnBPratSP21), Ourinhos (UnBPratSP22), Pratânia (UnBPratSP24), Rancharia (UnBPratSP26), Ribeirão Preto (UnBPratSP27), Santo Antônio do Aracanguá (UnBPratSP30), Santópolis do Aguapeí (UnBPratSP31) e Taciba (UnBPratSP33).

Para a espécie *P. brachyurus*, o par de primers 18S-F e ACM7-R foi utilizado, confirmando a presença da espécie em oito localidades: Guaianás (UnBPratSP12), Itaí (UnBPratSP15), Ituverava (UnBPratSP16), Jales (UnBPratSP19), Orlandia (UnBPratSP21), Rancharia (UnBPratSP26), Santo Antônio do Aracanguá (UnBPratSP30) e Santópolis do Aguapeí (UnBPratSP31). As amplificações positivas resultaram em fragmentos de DNA de ~267 pb. As demais amostras não apresentaram amplificação para esta espécie, e *P. brachyurus* também não foi detectado nas análises morfométricas realizadas nas amostras negativas. Os primers específicos para as espécies *P. jaehni* (Pj1-F e 5818-R), *P. coffeae* (PC1-F/PC2-R), *P. parazeae* (PpzF e PpzR), *P. penetrans* (PPEN-F e D3B-R) e *P. vulnus* (PVUL e D3B) não resultaram em amplificações positivas neste estudo. Além disso, as amostras UnBPratSP28, UnBPratSP10, UnBPratSP32, UnBPratSP3, UnBPratSP20 e UnBPratSP14, não apresentaram amplificação positiva para nenhum dos primers testados.

### **Análise morfológica das populações puras**

Com base nas observações morfológicas e morfométricas do gênero *Pratylenchus*, foram analisadas 35 populações axênicas originadas de um único indivíduo encontrado nas populações de campo. A partir de cada local amostrado, obteve-se uma população pura, exceto nas amostras UnBPratSP16 e UnBPratSP30, nas quais foram isoladas duas populações puras devido à presença de dois morfotipos distintos. De cada população pura, 10 espécimes adultos foram analisados para morfometria, as variáveis mensuradas incluíram: comprimento do corpo (L), comprimento do estilete (ST), diâmetro do bulbo do estilete ( $\emptyset$ STB), altura do bulbo do estilete (STB), comprimento da cauda (T), comprimento do esôfago (ESO), distância da vulva até o ânus (VA), diâmetro na região anterior ( $\emptyset$ LAN), diâmetro na região da vulva ( $\emptyset$ LVU), comprimento da sobreposição (EG), comprimento do corpo até a região da vulva (V), comprimento do corpo/menor largura do corpo (a), comprimento do corpo/comprimento do esôfago (b) e comprimento do corpo/comprimento da cauda (c). Os valores consolidados podem ser vistos na **Tabela 5**.

Os resultados morfométricos dos dois morfotipos foram consolidados, apresentando os valores mínimos, máximos e médias com desvio padrão. Para o morfotipo 1, os resultados foram: L variou de 430,70 a 582,20  $\mu\text{m}$  ( $509,9 \pm 42,4 \mu\text{m}$ ); T variou de 20,45 a 31,50  $\mu\text{m}$  ( $27,4 \pm 2,6 \mu\text{m}$ ); ESO variou de 74,52 a 102,10  $\mu\text{m}$  ( $85,5 \pm 7,0 \mu\text{m}$ ); ST variou de 14,13 a 17,12  $\mu\text{m}$  ( $15,2 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ); STB variou de 1,89 a 2,64  $\mu\text{m}$  ( $2,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ );  $\emptyset$ STB variou de 3,57 a 5,29  $\mu\text{m}$  ( $4,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ); VA variou de 96,04 a 149,19  $\mu\text{m}$  ( $120,4 \pm 11,7 \mu\text{m}$ );  $\emptyset$ LAN variou de 17,01 a 28,85  $\mu\text{m}$  ( $21,3 \pm 3,0 \mu\text{m}$ );  $\emptyset$ LVU variou de 17,15 a 33,85  $\mu\text{m}$  ( $24,4 \pm 3,7 \mu\text{m}$ ); V variou de 305,16 a 411,17  $\mu\text{m}$  ( $363,9 \pm 30,1 \mu\text{m}$ ); o índice V% variou entre 69% e 73% ( $71,4 \pm 0,8$ ); EG variou de 24,59 a 38,38  $\mu\text{m}$  ( $30,1 \pm 3,3 \mu\text{m}$ ). O índice a foi de  $24,3 \pm 3,1$  (19-30), b de  $6,0 \pm 0,4$  (4,9-6,8) e c de  $18,7 \pm 1,2$  (16-22). Os espécimes deste morfotipo demonstraram características típicas da espécie *P. zaeae*, conforme a chave de identificação de Castillo e Vovlas (2007) e de Oliveira et al., (2016).

Para o morfotipo 2, os valores foram: L variou de 489,86 a 727,88  $\mu\text{m}$  ( $607,2 \pm 72,2 \mu\text{m}$ ); T variou de 22,03 a 45,32  $\mu\text{m}$  ( $29,6 \pm 5,6 \mu\text{m}$ ); ESO variou de 89,54 a 141,60  $\mu\text{m}$  ( $110,8 \pm 14,5 \mu\text{m}$ ); ST variou de 15,30 a 20,76  $\mu\text{m}$  ( $18,3 \pm 1,4 \mu\text{m}$ ); STB

variou de 2,29 a 4,30  $\mu\text{m}$  ( $3,20\pm 0,5 \mu\text{m}$ );  $\emptyset\text{STB}$  variou de 4,18 a 5,92  $\mu\text{m}$  ( $5,0\pm 0,6 \mu\text{m}$ ); VA variou de 47,57 a 81,62  $\mu\text{m}$  ( $64,6\pm 9,3 \mu\text{m}$ );  $\emptyset\text{LAN}$  variou de 20,20 a 27,89  $\mu\text{m}$  ( $24,1\pm 2,4 \mu\text{m}$ );  $\emptyset\text{LVU}$  variou de 18,03 a 25,84  $\mu\text{m}$  ( $21,9\pm 1,9 \mu\text{m}$ ); V variou de 418,61 a 616,00  $\mu\text{m}$  ( $515,0\pm 60,6 \mu\text{m}$ ); o índice V% esteve entre 83% e 87% ( $84,8\pm 0,9$ ); EG variou de 30,24 a 57,92  $\mu\text{m}$  ( $43,8\pm 6,9 \mu\text{m}$ ). O índice a foi de  $25,2\pm 2,5$  (20-29), b de  $5,5\pm 0,6$  (4,0-6,4) e c de  $20,9\pm 2,8$  (15-27). As fêmeas deste morfotipo apresentaram variações morfológicas significativas, condizentes com a espécie *P. brachyurus*, conforme a chave de identificação de Castillo e Vovlas (2007) e de Oliveira et al., (2016).

As medições dos 350 indivíduos analisados foram submetidas à análise de PCA. A análise de PCA aplicada aos dados morfométricos revelou a formação de dois componentes principais (CPs), que juntos explicam 60,5% da variância total, confirmando a presença de dois grupos. O biplot apresentado na **Figura 3** separou em dois grupos distintos, correspondentes às espécies *P. zaeae* e *P. brachyurus*. O primeiro componente (CP1) explicou 38,2% da variância, enquanto o segundo (CP2) explicou 22,3%. O CP1 apresentou valores positivos para todas as características analisadas, enquanto o CP2 foi positivo para cinco características específicas: VA,  $\emptyset\text{LVU}$ ,  $\emptyset\text{LAN}$ , T e L.

### **Análise filogenética confirma a ocorrência de *P. zaeae* e *P. brachyurus* em cana-de-açúcar**

Para confirmar a identificação das espécies, o DNA foi extraído das populações axênicas mantidas em cilindros de cenouras. A PCR das regiões D2-D3 do gene 28S, COI e ITS produziu amplicons de ~838, 405 e 1000 pb, respectivamente. As sequências de outras espécies de *Pratylenchus* depositadas no GenBank, junto com as novas sequências, foram alinhadas para a análise de IB. Em todos os alinhamentos, o modelo evolutivo GTR+I+G foi selecionado pelo MrModelTest para construir a árvore filogenética.

O gene D2-D3 do 28S apresentou 744 caracteres totais, 363 sítios conservados, 360 variáveis e 263 informativos para parcimônia. O gene COI teve 421 caracteres totais, 149 sítios conservados, 271 variáveis e 213 informativos para

parcimônia. O gene ITS apresentou 983 caracteres totais, 232 sítios conservados, 623 variáveis e 425 informativos para parcimônia.

As três regiões sequenciadas resolveram a filogenia de *Pratylenchus* em nível de espécie. Algumas sequências de isolados por não gerarem sequências de qualidade suficiente. Na análise IB do gene D2-D3 do 28S, as 28 sequências dos isolados deste estudo foram agrupadas em um clado (*posterior probability*, PP >0.97), juntamente com as sequências de referências de *P. zaeae*. A árvore revelou variação genética entre os isolados de *P. zaeae*, formando dois subclados: o primeiro, com 14 isolados (UnBPratSP17, UnBPratSP5, UnBPratSP29, UnBPratSP19, UnBPratSP21, UnBPratSP1, UnBPratSP11, UnBPratSP25, UnBPratSP20, UnBPratSP26, UnBPratSP16, UnBPratSP28, UnBPratSP33 e UnBPratSP31) e duas sequências do GenBank (KU198950.1 e KU198951.1); o segundo, com 14 isolados (UnBPratSP15, UnBPratSP3, UnBPratSP27, UnBPratSP8, UnBPratSP24, UnBPratSP22, UnBPratSP6, UnBPratSP14, UnBPratSP30, UnBPratSP9, UnBPratSP7, UnBPratSP23, UnBPratSP12 e UnBPratSP10) e uma sequências de do GenBank (EU130891.1). A espécie mais próxima foi *P. parazeae* (**Figura 4**).

A filogenia do gene COI agrupou as 25 sequências obtidas em um único clado (PP>0.99) com as sequências de *P. zaeae* obtidas do GenBank, separando-as de *P. parazeae*. Similar a árvore filogenética do gene 28S, a região COI mostrou polimorfismos nas sequências dos isolados de *P. zaeae*, dividindo-os em dois subclados: o primeiro, com 16 isolados (UnBPratSP21, UnBPratSP29, UnBPratSP17, UnBPratSP20, UnBPratSP25, UnBPratSP30, UnBPratSP12, UnBPratSP23, UnBPratSP31, UnBPratSP19, UnBPratSP24, UnBPratSP5, UnBPratSP27, UnBPratSP13, UnBPratSP3 e UnBPratSP33); o segundo, com nove isolados (UnBPratSP11, UnBPratSP9, UnBPratSP22, UnBPratSP15, UnBPratSP6, UnBPratSP8, UnBPratSP16, UnBPratSP10 e UnBPratSP26), e três sequências do GenBank (KU198935.1, KX349418.1 e KX349415.1) (**Figura 5**).

A árvore baseada no gene ITS agrupou todas as sequências de *P. zaeae* em um clado (PP>1), incluindo as quatro de referências do GenBank, separando-as de outros clados, como *P. parazeae*. Contudo, observou-se variabilidade genética entre os isolados, formando oito subgrupos. A árvore revelou que a sequência do isolado

UnBPratSP30.1 pertence a espécie *P. brachyurus*, agrupando-se com sequências do GenBank (FJ712897.1, HQ662583.1, FJ712898.1 e KY828251.1) (**Figura 6**).

## DISCUSSÃO

A identificação precisa e acurada de espécies de *Pratylenchus* é fundamental para definir estratégias eficazes de controle em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Entretanto, pouco se conhece sobre as espécies presentes nas principais regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil. Este estudo apresenta uma análise detalhada das espécies de *Pratylenchus* associadas à cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo, empregando uma abordagem de taxonomia integrativa que combina métodos morfológicos, morfométricos e moleculares. Os resultados confirmam a presença de duas espécies: *P. zae* e *P. brachyurus*, sendo a primeira predominante em todas as áreas amostradas, enquanto a segunda ocorrendo em coinfeção em dois municípios - Ituverava (UnBPratSP16) e Santo Antônio do Aracanguá (UnBPratSP30).

A predominância de *P. zae* está em conformidade com estudos prévios realizados em outras regiões produtoras do Brasil e em outros países tropicais e subtropicais da África, Ásia, Américas e Oceania (Castillo & Vovlas, 2007; CABI, 2022). A ampla distribuição de *P. zae* indica sua eficiente adaptação a diferentes condições edafoclimáticas e sistemas de cultivo de cana-de-açúcar globalmente e no estado de São Paulo. Esta espécie é frequentemente associada a diferentes hospedeiros, especialmente plantas monocotiledôneas. Embora a maior prevalência e multiplicação de espécimes de *P. zae* sejam observadas em monocotiledôneas, pouco se compreende se isso resulta de fatores estruturais, bioquímicos, genéticos ou fisiológicos pré ou pós-formados nas plantas, o que torna necessários estudos mais aprofundados sobre o tema.

Apesar da ocorrência de *P. brachyurus* ser menos comum, estudos anteriores indicam sua importância como praga, e grande potencial em causar danos quando em populações mistas com *P. zae* na cana-de-açúcar (Bellé et al., 2014; Dutra et al., 2022). A presença simultânea dessas duas espécies de nematoide na cana-de-açúcar não é rara, sendo que *P. zae* costuma apresentar uma densidade média maior que *P. brachyurus* (Barbosa et al., 2013; Martinha et al., 2022). Esse predomínio de *P. zae* sobre *P. brachyurus* pode ser observado em diversos levantamentos

nematológicos, como os realizados por Severino et al., (2010) e Bellé et al., (2017), como também observa-se uma distribuição variável dessas populações em áreas canavieiro (Dinardo-Miranda e Fracasso, 2019). A crescente presença de *P. brachyurus* em áreas agrícolas pode estar relacionado às crescentes práticas de rotação de cultura com plantas para adubação verde e oleaginosas, como a soja, no processo de reforma das áreas de canaviais (Oliveira et al., 2012). *P. brachyurus* é um dos principais fitonematoides da cultura da soja (Goulart, 2008), o que pode ter contribuído para sua multiplicação em áreas consorciadas com cana-de-açúcar, considerando que *P. brachyurus* parece ser autóctone do território brasileiro (Freitas et al., 2019). Além disso, as mudanças no sistema de produção ao longo dos anos, como o plantio direto e/ou o plantio em áreas degradadas de pastagem, também favoreceram o aumento desse nematoide (Franchini et al., 2014; Debiassi et al., 2016).

As análises morfológicas e morfométricas corroboraram com os dados moleculares na identificação das espécies e evidenciaram a alta variabilidade intraespecífica. A princípio, a análise de multivariada discriminou claramente os dois morfotipos correspondentes a *P. zaeae* e *P. brachyurus*, apesar das conhecidas limitações na distinção morfológica de espécies de *Pratylenchus*, devido à plasticidade fenotípica e sobreposição de caracteres entre algumas espécies (Castillo e Vovlas, 2007; Subbotin et al., 2008). Características como o número de anéis labiais, o comprimento do estilete, a posição da vulva em relação ao corpo (V%) e a forma da terminação da cauda são relevantes para a distinção de espécies conforme Graham (1951) e evidenciadas na análise de PCA. Neste estudo, o comprimento do estilete variou de 14,13 a 17,12  $\mu\text{m}$  e de 15,30 a 20,76  $\mu\text{m}$ , e o V% de 69% e 73% e de 83% e 87%, apresentando alta variação, mas os valores médios para cada população estavam dentro da faixa relatada para *P. zaeae* e *P. brachyurus*, respectivamente (Castillo e Vovlas, 2007). Essas variáveis morfológicas e morfométricas intraespecíficas podem ser influenciadas por condições ambientais e/ou hospedeiras (Castillo e Vovlas, 2007).

Nos isolados coletados no estado de São Paulo, também se observou uma variação significativa no comprimento do corpo de *P. zaeae*, variando de 430,70 a 582,20  $\mu\text{m}$ . Analisando a média (509,9  $\mu\text{m}$ ), os espécimes permaneceram dentro do intervalo descrito por Graham (1951) para a espécie (Castillo e Vovlas, 2007), corroborando com resultados encontrados por Gamboa-Cortés et al., (2023) na Costa

Rica com comprimento dos isolados variando de 341,30 a 533,90  $\mu\text{m}$ , na cultura do arroz (*Oryza sativa*). No Brasil, estudos realizados no estado de Pernambuco apresentam variações semelhantes às observadas em São Paulo, com casos de isolados variando de 570,00 a 700,00  $\mu\text{m}$  (Jesus et al., 2020). A mesma variabilidade foi encontrada nos isolados de *P. brachyurus*, cujo comprimento variou de 489,86 a 727,88  $\mu\text{m}$ , estando dentro dos parâmetros descritos na chave de Castillo e Vovlas (2007). No entanto, variações no comprimento podem ocorrer em diferentes estudos e regiões (Gamboa-Cortés et al., 2023), conforme indicado por pesquisas no Brasil (Machado et al., 2015).

A presença de populações mistas de *P. zea* e *P. brachyurus* é preocupante, pois pode intensificar os danos às plantas hospedeiras e complicar estratégias de manejo. Embora *P. brachyurus* tenha sido confirmada em duas áreas de cultivos, testes com o primer específico 18s-F e ACM7-R detectaram a espécie em oito áreas, incluindo as duas confirmadas morfologicamente e por sequenciamento de DNA de populações puras. O resultado sugere que a porcentagem de áreas com coinfeção de *P. zea* e *P. brachyurus* em campos comerciais de cana-de-açúcar pode ser ou ficar maior do que imaginava. Os testes de PCR com primers específicos mostram alta sensibilidade, sendo capazes de detectar pequenas quantidades de material genético (Chowdhury e Yan, 2021). Isso pode explicar a detecção em um número maior de amostras, que devem ser melhor investigadas para confirmar a presença da coinfeção.

Por outro lado, os testes para detecção de *P. zea* com os primers 18sF e Praty-R foram insatisfatórios, amplificando apenas 22 amostras (66%). A não confirmação pode dever-se às limitações metodológicas, como especificidade dos primers ou mutações nas regiões-alvo do DNA (Waeyenberge et al., 2009). Embora os genes 18S e 5.8S, onde os primers foram desenhados, sejam altamente conservados, esse resultado não é uma surpresa, uma vez que Berry et al., (2008) relatou que o primer Praty-R, embora detectasse as populações testadas, não apresentava similaridade 100% com a sequência de alguns isolados depositados no GenBank. O desenho dos primers baseados em populações coletadas em poucas regiões, como o Japão e África do Sul (Ueraha et al., 1999; Berry et al., 2008), podem não representar toda a variabilidade da espécie. Assim, novos primers específicos devem ser desenvolvidos para abranger a variabilidade genética brasileira.

A aplicação de técnicas moleculares, como amplificação das regiões D2-D3 do 28S, COI e ITS, forneceu critérios adicionais para a identificação e delimitação das espécies de *Pratylenchus*. A formação de subclados nas análises sugere uma alta variação genética em *P. zae* em São Paulo, o que é consistente com relatos de variabilidade genética em outros países (Wang et al., 2015; Janssen et al., 2017) e corroboram com as variações morfológicas e morfométricas observadas. Além disso, devido a ausência de caracteres morfológicos e morfométricos que diferenciam *P. zae* e *P. parazeae*, foi necessário sequenciar as regiões mencionadas para confirmar a ausência de *P. zae*. Estudos prévios demonstraram variações do comprimento e polimorfismos da região analisadas até mesmo entre indivíduos da mesma espécie do gênero *Pratylenchus* (Orui, 1996; Uehara et al., 1998; Uehara et al., 1999; Waeyenberge et al., 2000). Este estudo corrobora com outros estudos, nos quais foram encontradas variações ao nível de espécie ou de indivíduos nas sequências do ITS, COI e 28S (De Luca et al., 2011; Wang et al., 2015). A ausência de machos em *P. zae* e o alto polimorfismo em regiões conservadas de organismos de reprodução partenogenética do gênero *Pratylenchus* precisa ser melhor investigado, mas pode estar associado à ocorrência de cariótipos poliploides, indicando duplicação do genoma ou eventos de hibridização (Román e Triantaphyllou, 1969).

Estudos mostram que a coinfeção por múltiplas espécies de nematoides pode levar a interações sinérgicas, aumentando a severidade dos sintomas e as perdas de produtividade, favorecendo também o complexo com outros patógenos (Benjamin et al., 2024; Parrado e Quintanilla, 2024). Além disso, a variabilidade genética observada pode influenciar a eficácia de medidas de controle, como a resistência varietal, o uso de nematicidas (Dinardo-Miranda et al., 2008, 2010) e o controle biológico (Morgado et al., 2015; Oliveira et al., 2011c). A presença de *P. brachyurus* tem se tornado cada vez mais frequente, embora o real dano dessa praga na cultura ainda seja discutido (Dinardo-Miranda, 2005). No entanto, já se sabe que esse nematoide é capaz de se estabelecer e multiplicar em cultivares de cana-de-açúcar (Dinardo-Miranda e Ferraz, 1991). Um estudo conduzido por Barbosa et al., (2013) testou a agressividade de *P. brachyurus* em algumas cultivares comerciais de cana-de-açúcar, comparando-o com o principal nematoide da cultura, *P. zae*, e observou que uma densidade menor de *P. brachyurus* foi suficiente para causar danos semelhantes aos causados por *P.*

zeae. Além disso, Santos et al., (2012) avaliaram a suscetibilidade de 30 variedades de cana-de-açúcar, incluindo genótipos tradicionais no mercado e novos materiais. Os resultados obtidos indicaram a necessidade de maiores estudos para a resistência e controle desses fitonematoides, uma vez que a maioria das variedades comerciais disponíveis é suscetível aos nematoides-das-lesões-radiculares, e todas as variedades avaliadas foram suscetíveis à *P. zae* e *P. brachyurus*.

Embora descrições de espécies deste gênero sejam tradicionalmente baseadas em abordagens morfoanatômica, este estudo fornece dados moleculares consistentes para a identificação de *Pratylenchus*, que se mostraram comparáveis a outros estudos. Além disso, nossos achados ressaltam a necessidade de programas de monitoramento contínuo e abrangente das populações de nematoides nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar. A identificação precisa das espécies presentes é essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo integradas e eficazes. O uso de técnicas moleculares deve ser incentivado, não apenas pela precisão diagnóstica, mas também pela possibilidade de detecção precoce e monitoramento de possíveis novas espécies e variantes que possam emergir devido às mudanças nas práticas agrícolas ou condições.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Banna, L., Ploeg, A. T., Williamson, V. M., & Kaloshian, I. (2004). Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of nematology*, 36(2), 142–146.
- Amaral, A.L.D., Câmara, T.M.M., De Moraes, L.K., Santiago, A.D., Ramos, S.R.R., Gimenes, M.A., Ledo, A.S. & Fernandes, M. (2015). Banco ativo de germoplasma de *Saccharum* spp. na Embrapa. Anais do II Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 72.
- Barbosa, B. F. F., Dos Santos, J. M., Barbosa, J. C., Soares, P. L. M., Ruas, A. R., & De Carvalho, R. B. (2013). Aggressiveness of *Pratylenchus brachyurus* to sugarcane, compared with key nematode *P. zaei* [agressividade de *P. brachyurus* à cana-de-açúcar, comparada ao do nematoide-chave *P. zaei*]. *Nematropica*, 119-130.
- Bellé, C., S. M. Kulczynski, C. B. Gomes, and P. R. Kuhn. (2014). Plant-parasitic nematodes associated with sugarcane crop in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Nematropica*, 44:207-217.
- Bellé, C., Kulczynski, S. M., Kuhn, P. R., Donini, L. P., & Gomes, C. B. (2017). REACTION OF SUGARCANE GENOTYPES TO PARASITISM OF *Meloidogyne javanica* AND *Pratylenchus zaei*. *Revista Caatinga*, 30(2), 530–535.
- Benjamin, J., Miriyagalla, S., Adebajo, O., Bonaparte, A., & Ottun, A. (2024). Interactions between plant parasitic nematodes and other harmful organisms. *Indian Phytopathology*, 77(3), 599–614.
- Berry, S. D., Cadet, P., & Spaul, V. W. (2017). Nematode pests of sugarcane. Em *Nematology in South Africa: A View from the 21st Century* (p. 261–284). Springer International Publishing.
- Berry, S. D., Fargette, M., Spaul, V. W., Morand, S., & Cadet, P. (2008). Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaei*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 22(3), 168–176.
- Berry, S. D., Rhodes, R., Foster, J., Risede, J.-M., & van Antwerpen, R. (2011). The effect of cover crops on plant parasitic-nematodes of sugarcane. *International Journal of Pest Management*, 57(4), 363–375.
- Bhuiyan, S. A., & Garlick, K. (2021). Evaluation of root-lesion nematode (*Pratylenchus zaei*) resistance assays for sugarcane accession lines. *Journal of Nematology*, 53(1), 1–10.
- Bhuiyan, S. A., Garcia-Cuenca, S., Garlick, K., & Eglinton, J. (2022). Survey of plant-parasitic and free-living nematodes in New South Wales cane-growing areas.

Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists, volume 43, 63–70.

Bhuiyan, S. A., Sherring, K., & Eglinton, J. (2024). Parasitic nematodes of sugarcane: A major productivity impediment and grand challenges in management. *Plant Disease*.

Bordonal, R. de O., Carvalho, J. L. N., Lal, R., de Figueiredo, E. B., de Oliveira, B. G., & La Scala, N., Jr. (2018). Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(2).

Bremer, G. (1961). Problems in breeding and cytology of sugar cane. *Euphytica; Netherlands Journal of Plant Breeding*, 10(1), 59–78.

Butterfield, M. K., D'Hont, A., & Berding, N. (2001). The sugarcane genome. A synthesis of current understanding, and lessons for breeding and biotechnology. Proceedings of the South African Sugar Technologists Association 75,1–5.

CABI. (2022). *Pratylenchus zae* (root lesion nematode). *CABI Compendium*, *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.43905>

Cadet, P., & Spaul, V. W. (2005). Nematode parasites of sugarcane. In Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture (pp. 645-674). Wallingford UK: CABI Publishing.

Cardoso, M. de O., Pedrosa, E. M. R., Ferris, H., Rolim, M. M., Vicente, T. F. da S., & David, M. F. de L. (2015). Comparing sugarcane fields and forest fragments: the effect of disturbance on soil physical properties and nematode assemblages. *Soil Use and Management*, 31(3), 397–407.

Castillo, P., & Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Brill. ISBN-13 978-9004155640

Chowdhury, I. A., & Yan, G. (2021). 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 Sciences*, 22(11), 5872.

CONAB. (2024). Acomp. safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, v. 11 – Safra 2023/24, n.4 - Quarto levantamento, p. 1-52. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Consultado em 25/10/2024.

Consoli, E. A., Oliveira, S. A., Harakava, R., & Oliveira, C. M. G. (2012). Desenvolvimento de diagnostico molecular para a identificação de *Pratylenchus jaehni*. *Nematologia Brasileira*, 36, 62-70.

Coolen, W. A., & D'herde, C. J. (1972). A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue.

da Silva, W. R., Divers, M., Correia, G. S., de Oliveira Martins, S., Schafer, J. T., de Araujo Filho, J. V., de Barros, D. R., & Gomes, C. B. (2023). Characterization of *Mesocriconema* species associated with grapevine decline disease in southern Brazil. *Tropical Plant Pathology*.

- Daniels, J., & Roach, B. T. (1987). Taxonomy and Evolution. Em *Developments in Crop Science* (p. 7–84). Elsevier.
- De Ley, P., Felix, M. A., Frisse, L., Nadler, S., Sternberg, P., & Thomas, W. K. (1999). Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology: international journal of fundamental and applied nematological research*, 1(6), 591–612.
- De Luca, F., Reyes, A., Troccoli, A., & Castillo, P. (2011). Molecular variability and phylogenetic relationships among different species and populations of *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) as inferred from the analysis of the ITS rDNA. *European Journal of Plant Pathology*, 130(3), 415–426.
- De Luca, F., Reyes, A., Troccoli, A., & Castillo, P. (2011). Molecular variability and phylogenetic relationships among different species and populations of *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) as inferred from the analysis of the ITS rDNA. *European Journal of Plant Pathology*, 130(3), 415–426.
- de Moraes, L. K., de Aguiar, M. S., de Albuquerque e Silva, P., Câmara, T. M. M., Cursi, D. E., Júnior, A. R. F., Chapola, R. G., Carneiro, M. S., & Bessalho Filho, J. C. (2015). Breeding of sugarcane. Em *Handbook of Plant Breeding* (p. 29–42). Springer New York.
- Debiasi, H., Franchini, J. C., Dias, W. P., Ramos Junior, E. U., & Balbinot Junior, A. A. (2016). Práticas culturais na entressafra da soja para o controle de *Pratylenchus brachyurus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(10), 1720–1728.
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., & Moens, T. (2010). Exploring the use of *cytochrome oxidase c subunit 1* (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PloS one*, 5(10), e13716.
- Dinardo-Miranda, L. L., & Ferraz, L. C. C. B. (1991). Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e *Pratylenchus zaeae* a duas variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*). *Nematologia Brasileira*, 15(1), 9-16.
- Dinardo-Miranda, L. L., & Fracasso, J. V. (2009). Spatial distribution of plant-parasitic nematodes in sugarcane fields. *Scientia agricola*, 66(2), 188–194.
- Dinardo-Miranda, L. L., Fracasso, J. V., & Costa, V. P. (2010). Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras colhidas em início de safra sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. *Nematologia Brasileira*, 34(2), 106-117.
- Dinardo-Miranda, L. L., Pivetta, J. P., & Fracasso, J. V. (2008). Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. *Bragantia*, 67, 179-190.
- Dinardo-Miranda, L.L. (2005). Nematoides e pragas de solo em cana-de-açúcar. *Informações agronômicas* 110(1), 25-32.

- Dinesh Babu, K. S., Janakiraman, V., Palaniswamy, H., Kasirajan, L., Gomathi, R., & Ramkumar, T. R. (2022). A short review on sugarcane: its domestication, molecular manipulations and future perspectives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(8), 2623–2643.
- Evans, D. L., & Joshi, S. V. (2016). Complete chloroplast genomes of *Saccharum spontaneum*, *Saccharum officinarum* and *Miscanthus floridulus* (Panicoideae: Andropogoneae) reveal the plastid view on sugarcane origins. *Systematics and Biodiversity*, 14(6), 548–571.
- FAOSTAT. (2022a). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Consultado em 25/10/2024.
- FAOSTAT. (2022b). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em [https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity](https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity). Consultado em 25/10/2024.
- Fernandez, D., Petitot, A. S., de Sa, M. G., Nguyễn, V. P., de Almeida Engler, J., & Kyndt, T. (2015). Recent advances in understanding plant–nematode interactions in monocots. *Advances in Botanical Research*, 73, 189-219.
- Ferraz, L. C. C. B. (1999). Gênero *Pratylenchus*: os nematoides das lesões radiculares. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 7, 157-193.
- Ferraz, L. C. C. B., & BROWN, D. J. F. (2016). Nematologia de plantas: fundamentos e importância. *Manaus: Norma Editora*, 1, 251.
- Franchini, J. C., Debiasi, H., Dias, W. P., Ramos Junior, E. U., & Silva, J. F. V. (2014). Perda de produtividade da soja em área infestada por nematoide das lesões radiculares na região médio norte do Mato Grosso. *Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar*. Brasília: Embrapa. p. 274-278.
- Freitas, J. R. B., Teixeira, D. B., Moitinho, M. R., Silva Júnior, J. F., Siqueira, D. S., Barbosa, B. F. F., Soares, P. L. M., & Pereira, G. T. (2019). Distribuição espacial de *Pratylenchus brachyurus* em área de soja no Leste do Maranhão. *Revista brasileira de ciências agrárias/Brazilian journal of agricultural sciences*, 14(1), 1–6.
- Gamboa-Cortés, E., Peraza-Padilla, W., & Castillo, P. (2023). Morphometric and molecular identification of root-lesion nematodes, *Pratylenchus* Spp., from Costa Rica.
- García-Bustamante, C. A., Aguilar-Rivera, N., Zepeda-Pirron, M., & Armendáriz-Arnez, C. (2018). Development of indicators for the sustainability of the sugar industry. *Environmental & Socio-Economic Studies*, 6(4), 22–38.
- Gonzaga, V., & Santos, J. M. (2010). Estudo comparativo da multiplicação in vitro de seis espécies de *Pratylenchus* em cilindros de cenoura. *Nematologia brasileira*, 34, 226-230.
- Goulart, A. M. C. (2008). Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares(gênero *Pratylenchus*). Embrapa Cerrados. (Documento 219).

Handoo, Z., Carta, L., & Skantar, A. (2001). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus arlingtoni* n. sp., *P. convallariae* and *P. fallax* (Nematoda: Pratylenchidae). *Nematology: international journal of fundamental and applied nematological research*, 3(6), 607–618.

Healey, A. L., Garsmeur, O., Lovell, J. T., Shengquiang, S., Sreedasyam, A., Jenkins, J., Plott, C. B., Piperidis, N., Pompidor, N., Llaca, V., Metcalfe, C. J., Doležel, J., Cápál, P., Carlson, J. W., Hoarau, J. Y., Hervouet, C., Zini, C., Dievert, A., Lipzen, A., D'Hont, A. (2024). The complex polyploid genome architecture of sugarcane. *Nature*, 628(8009), 804–810.

Holtzmann, O. V. (1964). Nematodes and sugarcane. *Sugar-Cane Diseases of the World*. Vol. 2. C. G. Hughes, E. V. Abbott, and C. A. Wismer, eds. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, the Netherlands. Pages 317-341.

Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.

IBGE. (2022). Censo agropecuário. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cana-de-acucar/br>. Consultado em 25/10/2024.

Janssen, T., Karssen, G., Orlando, V., Subbotin, S. A., & Bert, W. (2017). Molecular characterization and species delimiting of plant-parasitic nematodes of the genus *Pratylenchus* from the penetrans group (Nematoda: Pratylenchidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 117, 30–48.

Jenkins, W. R. B. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil.

Jesus, A. M. D. E., Pedrosa, E. M. R., Reis, J. B. R. D. A. S., & Porto, A. C. F. (2020). Morphological and morphometric characterization of *Pratylenchus* species in sugarcane cropping areas of Pernambuco state. *Revista Caatinga*, 33(3), 599–607.

Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9), 946-961.

Jones, M. G. K., & Fosú-Nyarko, J. (2014). Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants: Molecular biology of root lesion nematodes. *The Annals of Applied Biology*, 164(2), 163–181.

Leme Filho, J.R.A. (2023). Artigo: Benefícios decorrentes do aumento da longevidade dos canaviais. Embrapa Agropecuária Oeste. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/78112275/artigo-beneficios-decorrentes-do-aumento-da-longevidade-dos-canaviais>. Consultado em 25/10/2024.

Loof, P. A. A. (1991). The family Pratylenchidae Thorne, 1949. In W. R. Nickle (Ed.), *Manual of agricultural nematology* (pp. 363–421). Marcel Dekker.

- Machado, A. C. Z., Ferraz, L. C. C. B., & De Oliveira, C. M. G. (2007). Development of a species-specific reverse primer for the molecular diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. *Nematropica*, 37: 249-257.
- Machado, A. C., Siqueira, K. M., Ferraz, L. C. C., Inomoto, M. M., Bessi, R., Harakava, R., & Oliveira, C. M. (2015). Characterization of Brazilian populations of *Pratylenchus brachyurus* using morphological and molecular analyses. *Tropical Plant Pathology*, 40, 102-110.
- Maranhão, S. R. V. L., Pedrosa, E. M. R., Guimarães, L. M. P., Chaves, A., Leitão, D. A. H. S., & Vicente, T. F. S. (2018). Nematode abundance and diversity in sugarcane fields in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43(6), 485–498.
- Martinha, D. D., Silva, M. C. C., Maceda, A., Hahn, M. H., Calegario, R., Ruaro, L., Oliveira, R. A. de, & Duarte, H. da S. S. (2022). Survey of nematodes associated with sugarcane in the state of Paraná, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 89.
- Masters, B. C., Fan, V., & Ross, H. A. (2011). Species delimitation—a geneious plugin for the exploration of species boundaries. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 154-157.
- Microscopy U.K., (2002). Mounting specimens on microscope slides. Disponível em: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artdec02/wdmount2.html>. Acesso: 07/11/2024.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In 2010 gateway computing environments workshop (GCE) (pp. 1-8). IEEE.
- Moody, E. H., Lownsbery, B. F., & Ahmed, J. M. (1973). Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. *Journal of Nematology*, 5(3), 225.
- Morgado, T. D. T., Guerra, J. T., de Araujo, F. F., & Mazzuchelli, R. D. C. L. (2015). Effectiveness and persistence of biological control of nematodes in sugarcane. *African journal of agricultural research*, 10(49), 4490-4495.
- Nguyen, H. T., Trinh, Q. P., Couvreur, M., Singh, P. R., Decraemer, W., & Bert, W. (2019). Molecular and morphological characterisation of a new root-lesion nematode, *Pratylenchus horti* n. sp. (Tylenchomorpha: Pratylenchidae), from Ghent University Botanical Garden. *Nematology: international journal of fundamental and applied nematological research*, 21(7), 739–752.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. den, Hockland, S., & Maafi, Z. T. (2011). Current nematode threats to world agriculture. Em *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions* (p. 21–43). Springer Netherlands.
- Noronha, M. de A., Muniz, M. de F. S., Cruz, M. de M., Assunção, M. C., Castro, J. M. da C. e., Oliveira, E. R. L. de, Miranda, C. G. dos S., & Machado, A. C. Z. (2017). Meloidogyne and *Pratylenchus* species in sugarcane fields in the state of Alagoas, Brazil. *Ciencia rural*, 47(2).

- Oliveira, A. F., Pereira, C. N., & Vieira, P. A. (2012). Análise da rotação de grãos na área de reforma de canavial. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 50., 2012, Vitória. Agricultura e desenvolvimento rural com sustentabilidade. Vitória: SOBER.
- Oliveira, C. M. G. D., Blok, V. C., Tomazini, M. D. O., Inomoto, M. M., & Bessi, R. (2011b). Técnicas moleculares e taxonomia clássica na diagnose de nematoides parasitos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 19, 309-336.
- Oliveira, C. M. G. D., Monteiro, A. R., & Blok, V. C. (2011a). Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology*, 36, 65-73.
- Oliveira, C. M., Fenton, B., Malloch, G., Brown, D. J., & Neilson, R. (2005). Development of species-specific primers for the ectoparasitic nematode species *Xiphinema brevicolle*, *X. diffusum*, *X. elongatum*, *X. ifacolum* and *X. longicaudatum* (Nematoda: Longidoridae) based on ribosomal DNA sequences. *Annals of Applied Biology*, 146(3), 281-288.
- Oliveira, M. K. D. S., Chaves, A., Vieira, D. A. D. N., da Silva, E. J., & Rodrigues, W. D. D. L. (2011c). Controle biológico de fitonematoides do gênero *Pratylenchus* através de inoculante natural em cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6(2), 203-207.
- Oliveira, R. S. de, Rios, A. D. F., Oliveira, M. H. R. de, Trindade, K. L., Silva, R. M. da, & Silva, G. T. da. (2019). Reação de genótipos de cana-de-açúcar ao nematoide das lesões radiculares. *Agrarian*, 12(44), 149–155.
- Oliveira, C. M. G., Santos, M. D., & Castro, L. H. S. (2016). Diagnose de fitonematoides. *Campinas: Millennium*.
- Orui, Y. (1996). Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP Analysis. *Applied Entomology and Zoology* 31, 505-514.
- Pankhurst, C. E., Blair, B. L., Magarey, R. C., Stirling, G. R., & Garside, A. L. (2005). Effects of biocides and rotation breaks on soil organisms associated with the poor early growth of sugarcane in continuous monoculture. *Plant and Soil*, 268(1), 255–269.
- Parrado, L. M., & Quintanilla, M. (2024). Plant-parasitic nematode disease complexes as overlooked challenges to crop production. *Frontiers in plant science*, 15.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 817-818.
- Powers, T. O., & Harris, T. S. (1993). A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of nematology*, 25(1), 1.

- Rambaut, A., Lam, T. T., Max Carvalho, L., & Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using Temp Est (formerly Path-O-Gen). *Virus evolution*, 2(1), vew007.
- Ramouthar, P. V., & Bhuiyan, S. A. (2018). Nematode parasites of sugarcane. In *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (pp. 658-686). Wallingford UK: CAB International.
- Randig, O., Leroy, F., & Castagnone-Sereno, P. (2001). RAPD characterization of single females of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 107(6), 639-643.
- Rêgo, G.M., & Hoeflich, V.A. (2001). Contribuição da pesquisa florestal para um ecossistema em extinção: Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 80p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 21 1.
- Rodrigues, G. S. de S. C., & Ross, J. L. S. (2020). *A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental*. EDUFU.
- Roman, J., & Hirschmann, H. E. D. W. I. N. G. (1969). Embryogenesis and post embryogenesis in species of *Pratylenchus* (Nematoda: Tylenchidae). In *Proc. Helm. Soc. Wash* (Vol. 36, pp. 164-174).
- Roman, J., & Triantaphyllou, A. C. (1969). Gametogenesis and reproduction of seven species of *pratylenchus*. *Journal of nematology*, 1(4), 357–362.
- Sánchez-Moreno, S., & Ferris, H. (2018). Nematode ecology and soil health. In *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (pp. 62-86). Wallingford UK: CAB International.
- Santos, D. A., Dias-Arieira, C. R., Souto, E. R., Biela, F., Cunha, T. P. L., Rogerio, F., Silva T. R. B., & Milani, K. F. (2012). Reaction of sugarcane genotypes to *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaeae*. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(2), 585-587.
- Severino, J. J., Dias-Arieira, C. R., & Tessmann, D. J. (2010). Nematodes associated with sugarcane (*Saccharum* spp.) in sandy soils in Parana, Brazil. *Nematropica*, 111-124.
- Siddiqi, M. (2000). *Tylenchida: Parasites of plants and insects, 2nd edition* (M. R. Siddiqi, Org.). CABI Publishing.
- Siddique, S., & Grundler, F. M. W. (2018). Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 102–108.
- Silva, M. S., Bandeira, M. A., Maranhão, S. R. V. L., Carvalho, R. M., & Pedrosa, E. M. R. (2016). Comportamento de genótipos RB de cana-de-açúcar ao parasitismo dos nematoides das galhas. *Revista brasileira de ciencias agrarias/Brazilian journal of agricultural sciences*, 11(2), 73–79.

- Subbotin, S. A., Ragsdale, E. J., Mullens, T., Roberts, P. A., Mundo-Ocampo, M., & Baldwin, J. G. (2008). A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2), 491–505.
- Subbotin, S. A., Sturhan, D., Chizhov, V. N., Vovlas, N., & Baldwin, J. G. (2006). Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology: international journal of fundamental and applied nematological research*, 8(3), 455–474.
- Subbotin, S., Waeyenberge, L., & Moens, M. (2000). Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology*, 2(2), 153-164.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120
- Troccoli, A., Subbotin, S. A., Chitambar, J. J., Janssen, T., Waeyenberge, L., Stanley, J. D., Duncan, L. W., Agudelo, P., Múnera Uribe, G. E., Franco, J., & Inserra, R. N. (2016). Characterisation of amphimictic and parthenogenetic populations of *Pratylenchus bolivianus* Corbett, 1983 (Nematoda: Pratylenchidae) and their phylogenetic relationships with closely related species. *Nematology: international journal of fundamental and applied nematological research*, 18(6), 651–678.
- Uehara, T., Kushida, A., & Momota, Y. (1999). Rapid and sensitive identification of *Pratylenchus* spp. using reverse dot blot hybridization. *Nematology*, 1(5), 549-555.
- Uehara, T., Mizukubo, T., Kushida, A., & Momota, Y. (1998). Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA.
- van Megen, H., van den Elsen, S., Holterman, M., Karssen, G., Mooyman, P., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., & Helder, J. (2009). A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology: international journal of fundamental and applied nematological research*, 11(6), 927–950.
- Verheye, W. (2010). Growth and production of sugarcane. *Soils, plant growth and crop production*, 2, 1-23.
- Vrain, T. C., Wakarchuk, D. A., Lévesque, A. 2., & Hamilton, R. I. (1992). Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group.
- Waeyenberge, L., Moens, M., Pinochet, J. & Vrain, T.C (2000). Molecular characterisation of *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphisms. *Nematology* 2, 135-142.

- Waeyenberge, L., Viaene, N., & Moens, M. (2009). Species-specific duplex PCR for the detection of *Pratylenchus penetrans*. *Nematology: international journal of fundamental and applied nematological research*, 11(6), 847–857.
- Wang JinCheng, W. J., Wei YaDong, W. Y., Gu JianFeng, G. J., Zhang RuiFeng, Z. R., Huang GuoMing, H. G., Wang Xuan, W. X., ... & Sun JianHua, S. J. (2012). Phylogenetic analysis of *Pratylenchus* (Nematoda, Pratylenchidae) based on ribosomal internal transcribed spacers (ITS) and D2-D3 expansion segments of 28S rRNA gene.
- Wang, D. Y.-C., Kumar, S., & Hedges, S. B. (1999). Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings. Biological Sciences*, 266(1415), 163–171.
- Wang, H., Zhuo, K., Ye, W., & Liao, J. (2015). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus parazeae* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) parasitizing sugarcane in China. *European Journal of Plant Pathology*, 143(1), 173–191.
- Winchester, J. A. (1969). Sugarcane nematode control in Florida. In: Peachey J.E., (Ed.), *Nematodes for tropical crops*, Technical communication, Common Bureau of Helminthology, St. Albans Herts, England.
- Zijlstra, C. (2000). Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 283-290.

**Tabela 1.** Número total de amostras, identificações e os municípios que compõem as áreas amostradas no estado de São Paulo, Brasil.

<b>N° Total</b>	<b>Identificação</b>	<b>Estado</b>	<b>Município</b>
1	UnBPratSP1	SP	Américo Brasiliense
2	UnBPratSP2	SP	Américo Brasiliense
3	UnBPratSP3	SP	Avaré
4	UnBPratSP4	SP	Barretos
5	UnBPratSP5	SP	Barretos
6	UnBPratSP6	SP	Barretos
7	UnBPratSP7	SP	Barretos
8	UnBPratSP8	SP	Bebedouro
9	UnBPratSP9	SP	Boa Esperança do Sul
10	UnBPratSP10	SP	Guaianás
11	UnBPratSP11	SP	Guaianás
12	UnBPratSP12	SP	Guaianás
13	UnBPratSP13	SP	Guaíra
14	UnBPratSP14	SP	Guaíra
15	UnBPratSP15	SP	Itaí
16	UnBPratSP16	SP	Ituverava
17	UnBPratSP17	SP	Jaboticabal
18	UnBPratSP18	SP	Jales
19	UnBPratSP19	SP	Jales
20	UnBPratSP20	SP	Miguelópolis
21	UnBPratSP21	SP	Orlândia
22	UnBPratSP22	SP	Ourinhos
23	UnBPratSP23	SP	Ouroeste
24	UnBPratSP24	SP	Pratânia
25	UnBPratSP25	SP	Rancharia
26	UnBPratSP26	SP	Rancharia
27	UnBPratSP27	SP	Ribeirão Preto
28	UnBPratSP28	SP	Ribeirão Preto
29	UnBPratSP29	SP	Santa Lucia
30	UnBPratSP30	SP	Santo Antônio do Aracanguá
31	UnBPratSP31	SP	Santópolis do Aguapeí
32	UnBPratSP32	SP	São Manuel
33	UnBPratSP33	SP	Taciba

**Tabela 2.** Primer espécie-específico utilizados na reação em cadeia da polimerase para identificação molecular de espécies do gênero *Pratylenchus* em campos de cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil.

Espécie	Primer	Sequência do Primer 5'-3'	Tamanho de fragmento	Referência
<i>P. vulnus</i>	PVUL	GAAAGTGAACGCATCCGCAA	287 pb	Al-banna et al. 2004
	D3B-R	TCGGAAGGAACCAGCTACTA		
<i>P. penetrans</i>	PPEN-F	TAAAGAATCCGCAAGGATAC	278 pb	Al-banna et al. 2004
	D3B-R	TCGGAAGGAACCAGCTACTA		
<i>P. zaeae</i>	18S-F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	250 pb	Berry et al. 2008
	Praty-R	CTGCATTGGAAGCGCGCTTG		
<i>P. coffeae</i>	PC1-F	ATGCGCACATTGCATTCA	632 pb	Uehara et al. 1998
	PC2-R	GAGCGAGAAACACCTCTCAC		
<i>P. parazeae</i>	PpzF	CTGCTGCTGGATCATTACATT	570 pb	Wang et al. 2015
	PpzR	TCAAATAGACATGCCCCAAT		
<i>P. jaehni</i>	Pj1-F	TGGTCAATGAATGTTACG	476 pb	Consoli et al. 2012
	5818-R	ACGARCCGAGTGATCCAC		
<i>P. brachyurus</i>	18S-F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	267 pb	Machado et al. 2007
	ACM7-R	GCWCCATCCAAACAAYGAG		

**Tabela 3.** Iniciadores universais utilizados na reação em cadeia da polimerase para amplificação e sequenciamento das regiões 28S, *Citocromo Oxidase I(COI)* e espaçador transcrito interno(ITS) de espécies de *Pratylenchus* em áreas de cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil.

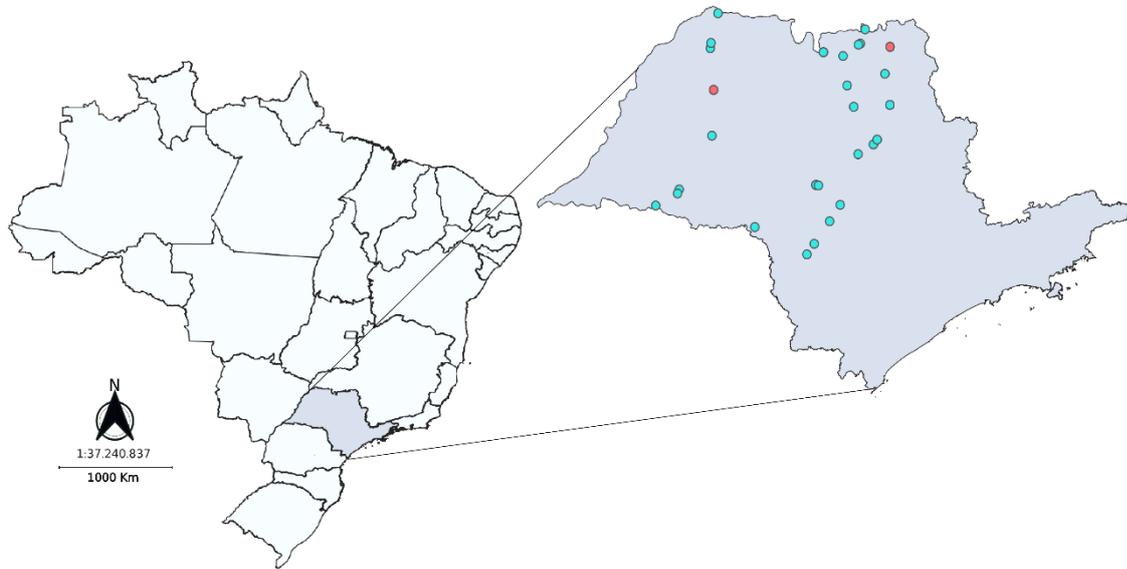
Região	Primer	Sequência do Primer 5'-3'	Tamanho de fragmento	Referência
28S	D2A	ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG	838 pb	De Ley et al. 1999
	D3B	TCGGAAGGAACCAGCTACTA		
COI	JB3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	405 pb	Derycke et al. 2010
	JB4.5	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG		
ITS	VRAIN2F	CTTTGTACACACCGCCCGTCGCT	961-1049 pb	Vrain et al.1992
	VRAIN2R	TTTCACTCGCCGTTACTAAGGGAATC		

**Tabela 4.** Número total de amostras, identificação dos municípios que compõem as áreas amostradas no estado de São Paulo, Brasil, e os resultados positivos e negativos da detecção utilizando primer espécie-específico.

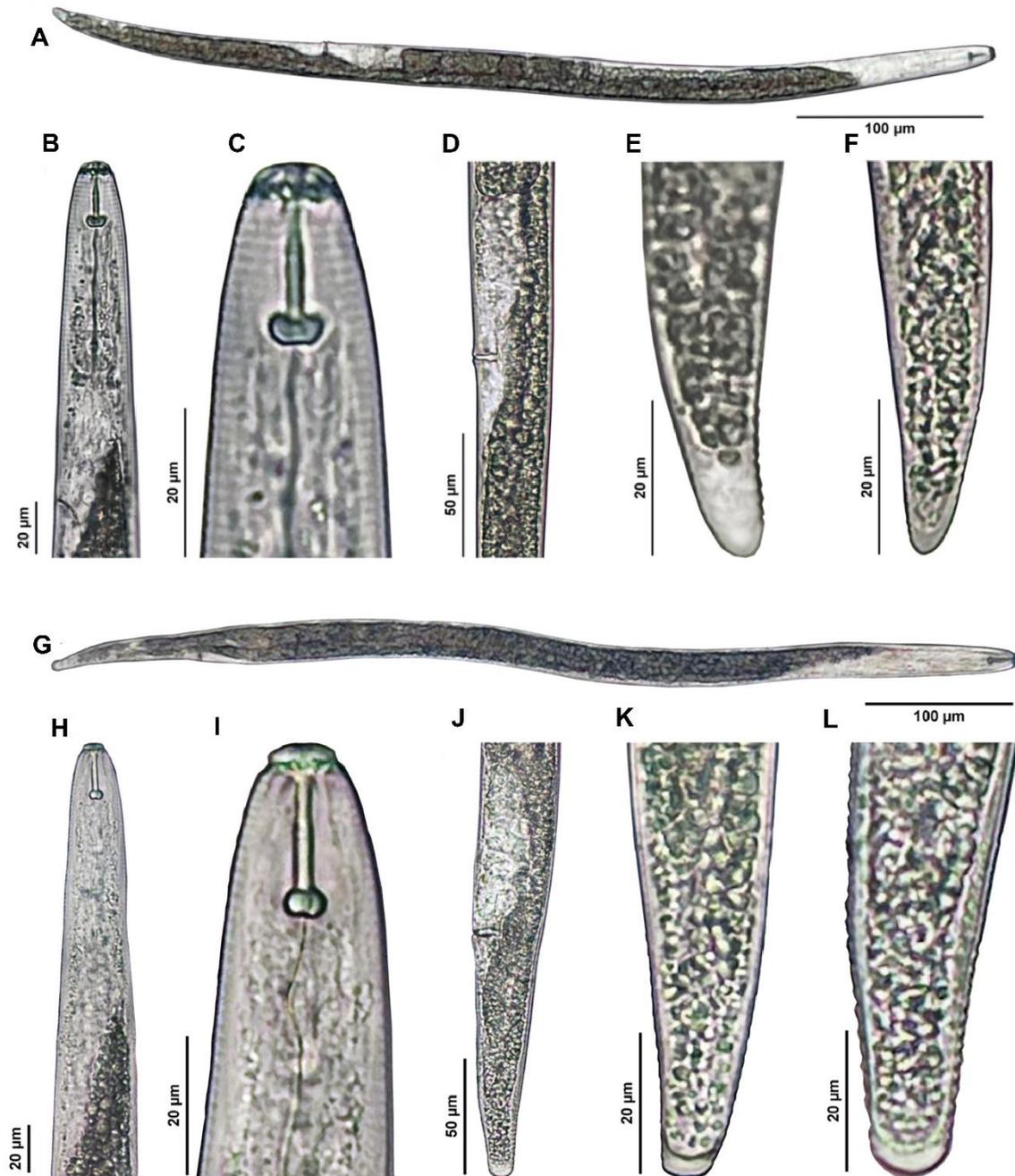
Nº Total	Identificação	Região	<i>P. zeae</i>	<i>P. brachyurus</i>
1	UnBPratSP1	Américo Brasiliense		
2	UnBPratSP2	Américo Brasiliense		
3	UnBPratSP3	Avaré		
4	UnBPratSP4	Barretos		
5	UnBPratSP5	Barretos		
6	UnBPratSP6	Barretos		
7	UnBPratSP7	Barretos		
8	UnBPratSP8	Bebedouro		
9	UnBPratSP9	Boa Esperança do Sul		
10	UnBPratSP10	Guaianás		
11	UnBPratSP11	Guaianás		
12	UnBPratSP12	Guaianás		
13	UnBPratSP13	Guáira		
14	UnBPratSP14	Guáira		
15	UnBPratSP15	Itaí		
16	UnBPratSP16	Ituverava		
17	UnBPratSP17	Jaboticabal		
18	UnBPratSP18	Jales		
19	UnBPratSP19	Jales		
20	UnBPratSP20	Miguelópolis		
21	UnBPratSP21	Orlândia		
22	UnBPratSP22	Ourinhos		
23	UnBPratSP23	Ouroeste		
24	UnBPratSP24	Pratânia		
25	UnBPratSP25	Rancharia		
26	UnBPratSP26	Rancharia		
27	UnBPratSP27	Ribeirão Preto		
28	UnBPratSP28	Ribeirão Preto		
29	UnBPratSP29	Santa Lucia		
30	UnBPratSP30	Santo Antônio do Aracanguá		
31	UnBPratSP31	Santópolis do Aguapeí		
32	UnBPratSP32	São Manuel		
33	UnBPratSP33	Taciba		



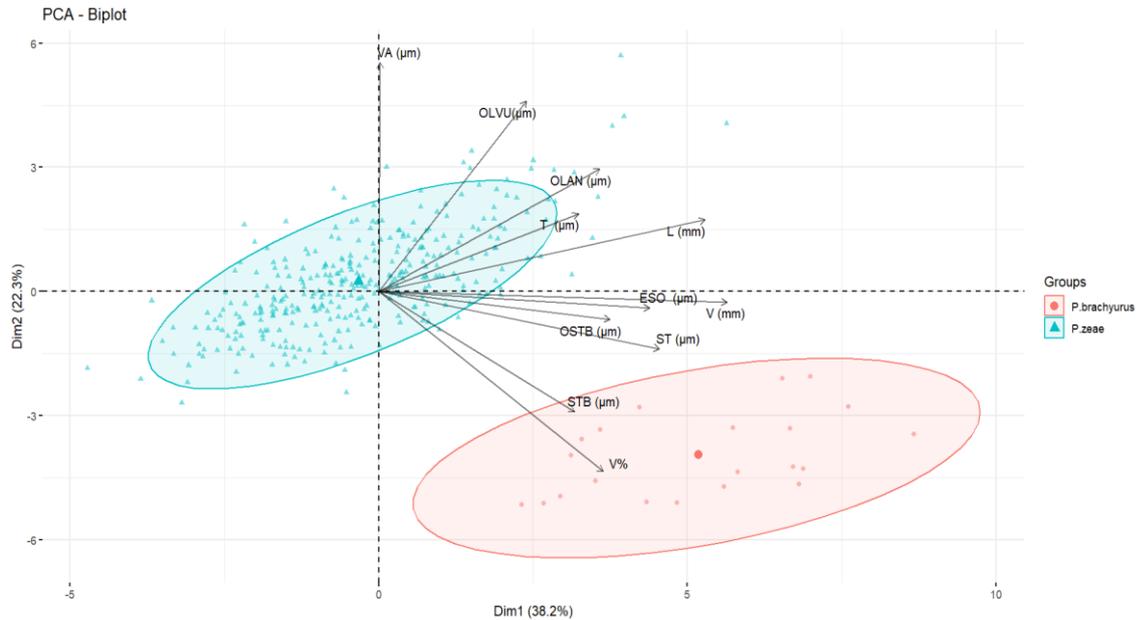
**Figura 1:** Mapa do Brasil destacando o estado de São Paulo, ilustrando a distribuição dos pontos de coleta de acordo com suas coordenadas geográficas. Os pontos em azul representam amostras em que se observou apenas *Pratylenchus zae* e os pontos vermelhos representam as populações mistas encontradas de *P. zae* e *P. brachyurus*.



**Figura 2.** Imagens de microscopia óptica de (A-F) *Pratylenchus zeae* e (G-L) *Pratylenchus brachyurus* encontrados em cana de açúcar no estado de São Paulo, Brasil.

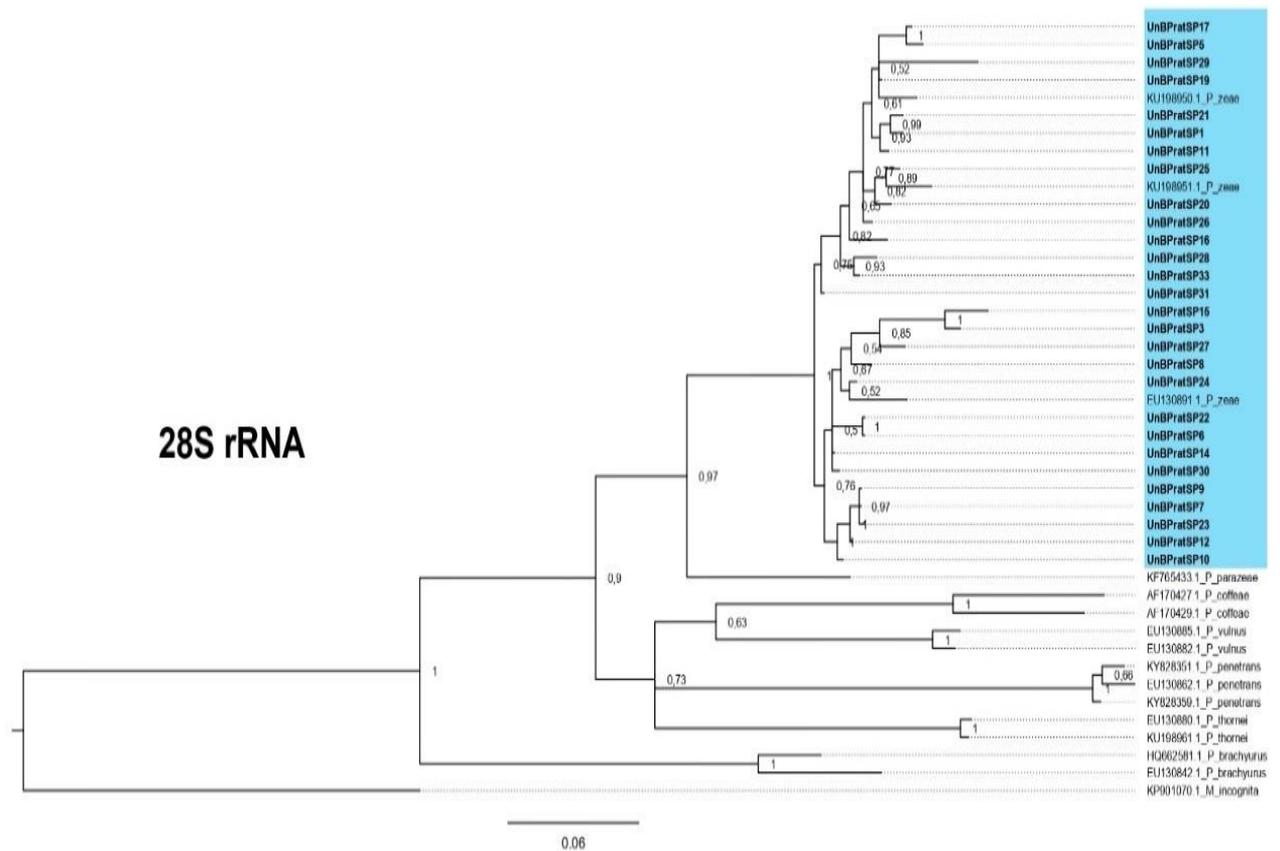


**Figura 3.** Biplot obtido a partir de dados morfológicos e morfométricos de populações de *Pratylenchus* coletados em campos comerciais de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil, submetidas à análise de componentes principais (PCA).



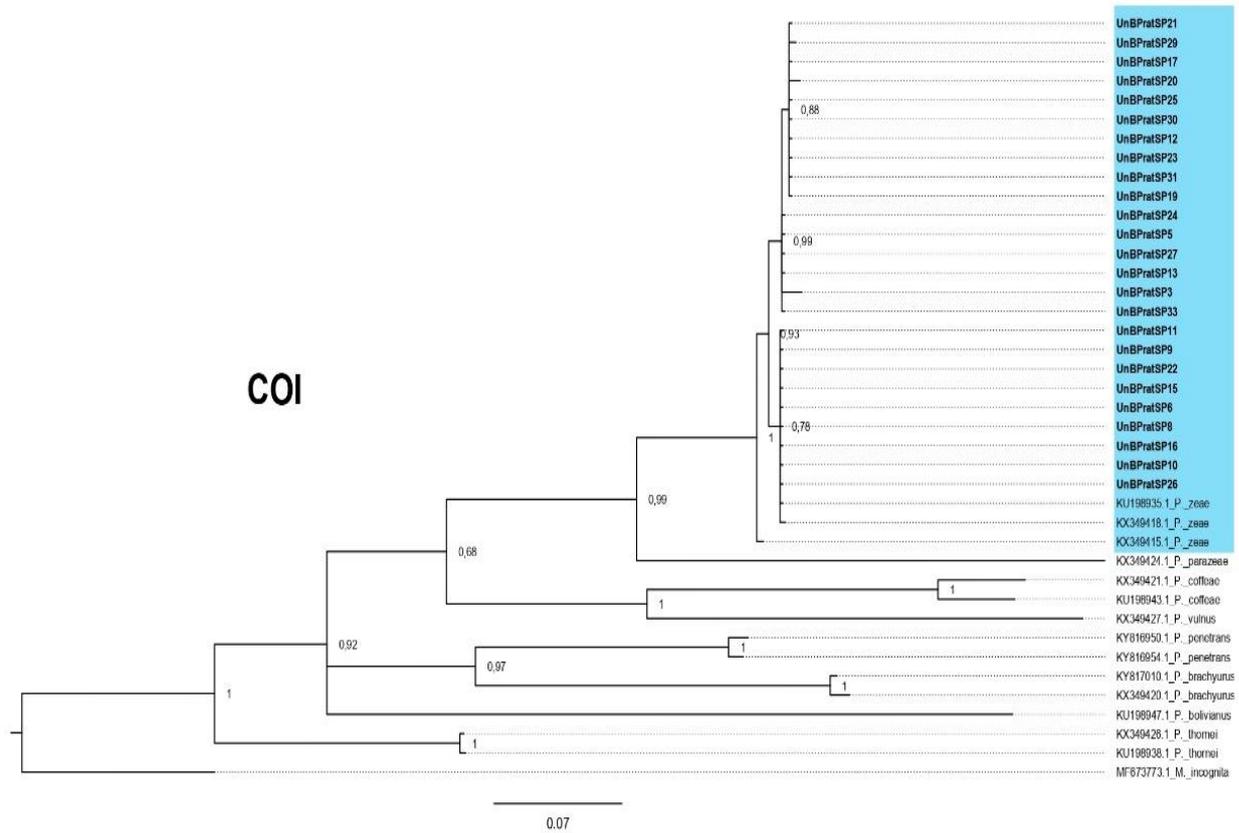
Comprimento do corpo (L), comprimento do estilete (ST), diâmetro do bulbo do estilete ( $\emptyset$ STB), altura dos bulbos do estilete (STB), comprimento da cauda (T), comprimento do esôfago (ESO), distância da vulva até o ânus (VA), diâmetro do corpo na região anterior ( $\emptyset$ LAN), diâmetro do corpo na região da vulva ( $\emptyset$ LVU), comprimento da sobreposição (EG) e distância da extremidade anterior até a vulva (V).

**Figura 4.** Relações filogenéticas dentro do gênero *Pratylenchus* coletados na cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo conforme inferido pela análise bayesiana a partir do D2-D3 das sequências do gene 28S usando o modelo evolutivo GTR+I+G.



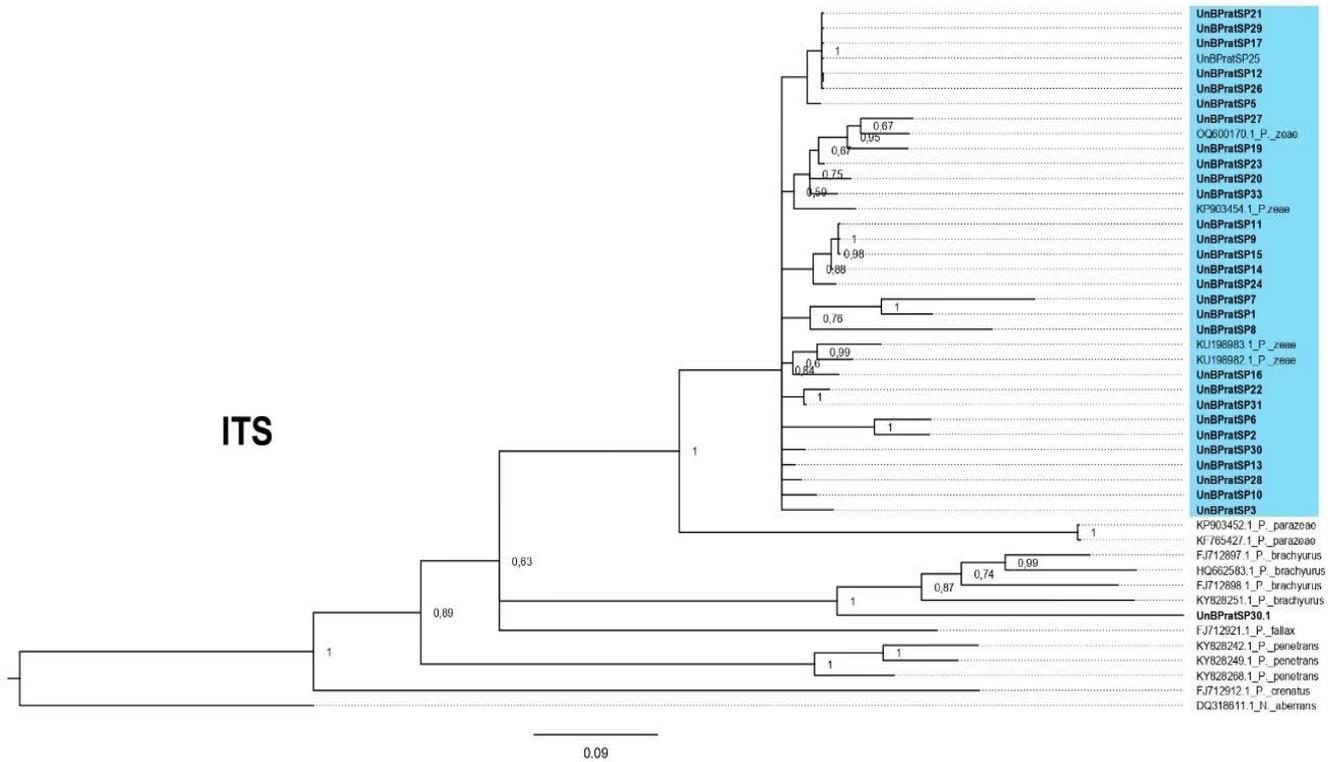
Sequências recém obtidas estão destacadas em negrito.

**Figura 5.** Relações filogenéticas dentro do gênero *Pratylenchus* coletados na cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo conforme inferido pela análise bayesiana a partir das sequências do gene *Citocromo Oxidase I*(COI) usando o modelo evolutivo GTR+I+G.



Sequências recém obtidas estão destacadas em negrito.

**Figura 6.** Relações filogenéticas dentro do gênero *Pratylenchus* coletados na cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo conforme inferido pela análise bayesiana a partir das sequências do gene do espaçador transcrito interno (ITS) usando o modelo evolutivo GTR+I+G.



Sequências recém obtidas estão destacadas em negrito.

