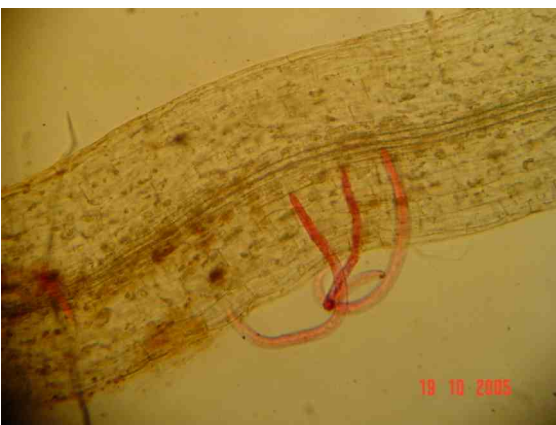


**Diagnóstico Molecular
para o Nematóide
*Rotylenchulus reniformis***



ISSN 1676-918X

Agosto, 2008

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 214

Diagnóstico Molecular para o Nematóide *Rotylenchulus reniformis*

*Maria Cristina Rocha Cordeiro
Alexandre Moura Cintra Goulart
Ana Maria Costa
Ravi Datt Sharma*

Planaltina, DF
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Fernanda Vidígal Cabral de Miranda*

Equipe de Revisão: *Fernanda Vidígal Cabral de Miranda*

Francisca Elijani do Nascimento

Jussara Flores de Oliveira Arbués

Normalização bibliográfica: *Marilaine Schaun Pelufê*

Editoração eletrônica: *Wellington Cavalcanti*

Capa: *Wellington Cavalcanti*

Foto(s) da capa: *Guilherme Lafourcade Asmus*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Alexandre Veloso

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2008): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

D536 Diagnóstico molecular para o nematóide *Rotylenchulus reniformis* / Maria Cristina Rocha Cordeiro... [et al.]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2008.
16 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; 214).

1. Biologia molecular. 2. Nematóide. I. Cordeiro, Maria Cristina Rocha. II. Série.

632.96 - CDD 21

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	9
Conclusões.....	15
Referências	15

Diagnóstico Molecular para o Nematóide *Rotylenchulus reniformis*

*Maria Cristina Rocha Cordeiro*¹

*Alexandre Moura Cintra Goulart*²

*Ana Maria Costa*³

*Ravi Datt Sharma*⁴

Resumo

O fitonematóide *Rotylenchulus reniformis* é uma espécie de ampla distribuição no mundo e é causa de perda de produção de diversas culturas agrônômicas. Constitui uma das espécies que mais ocorrem na região do Cerrado brasileiro. A identificação molecular é uma estratégia que tem o potencial de identificar sua ocorrência em amostras de solo infestado. O objetivo deste trabalho foi selecionar oligonucleotídeos gene específicos capazes de identificar o *R. reniformis*. Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados baseados em seqüências gênicas depositadas no banco de dados para o *R. reniformis*. Fragmentos de DNA foram amplificados, utilizando esses oligonucleotídeos em reação de polimerase em cadeia (PCR), e observados em gel de agarose a 2 %. Foram identificados três fragmentos de DNA potencialmente específicos. Esses fragmentos apresentaram um nível de detecção diferente, variando de 40 ng a 0,1 ng de DNA do nematóide em amostras. Essas diferenças de nível de detecção podem ser aperfeiçoadas com a utilização da PCR quantitativa (qPCR) de forma a contribuir para um diagnóstico também quantitativo do nematóide em amostras de solo infestado. Este trabalho representa um primeiro relato da tentativa da identificação e diagnose em nível molecular do *R. reniformis*.

Termos para indexação: diagnóstico, solos, Cerrado.

¹Bióloga, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Cerrados, cristina@cpac.embrapa.br

²Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Cerrados, goulart@cpac.embrapa.br

³Engenheira Agrônoma, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Cerrados, abarros@cpac.embrapa.br

⁴Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador aposentado da Embrapa Cerrados.

Rotylenchulus reniformis **Nematode Molecular Identification**

Abstract

The plant-parasitic nematode Rotylenchulus reniformis is a well world distributed species which causes loss of production in many agronomical cultures. Constitutes one of the most abundant species in the Brazilian Savannah region. The molecular identification is a strategy which has the potential to identify its occurrence in infested soil samples. The objective of this work was to select gene specific primer sequences capable to identify the R. reniformis. Specific primers were designed based on gene sequences deposited in gene bank for the R. reniformis. DNA fragments were amplified using these primers in polymerase chain reaction (PCR) and analyzed in 2 % agarose gel electrophoresis. Three potentially specific DNA fragments were selected. These fragments presented a different level of detection which varied from 40 ng to 0.1 ng of nematode DNA in samples. These differences on level of detection can be perfectionated using the quantitative PCR (qPCR) contributing to a quantitative molecular diagnostic parameter for the nematode in infested soil samples. This work constitutes the first one in order to identify and diagnosis the nematode R. reniformis molecular level.

Index terms: identification, soil, Savannah.

Introdução

O *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 é um nematóide fitoparasita conhecido com o nome comum de nematóide reniforme. Constitui a espécie de maior importância do gênero. Tem uma ampla distribuição no mundo e é causa de grandes perdas de produção de culturas agrônômicas tropicais e subtropicais (JATALA, 1991; ROBINSON et al., 1997). É uma das espécies que mais ocorrem no Cerrado brasileiro. No Brasil, há relatos de danos de *R. reniformis* às culturas de algodão (ASMUS; INOMOTO, 2007), soja (ASMUS et al., 2003) e melão (TORRES et al., 2006), suficientes para que esse nematóide seja considerado como um dos mais importantes, entre as espécies fitoparasitas. Também já foi observado em culturas como tomateiro, maracujazeiro, abacaxizeiro e cafeeiro (LORDELLO, 1988).

A identificação desse nematóide ainda hoje é majoritariamente realizada a nível morfológico por especialistas. Porém, a identificação molecular é uma estratégia que tem sido buscada para outros nematóides – tais como *Meloidogyne* Goeldi, 1892, *Pratylenchus* Filipjev, 1936 e *Heterodera* Schmidt, 1871 –, pois tem o potencial de identificar a presença do nematóide em diferentes amostras monoespecíficas ou de solo infestado, facilitando sua diagnose, diferenciação de outras espécies e controle. Com o diagnóstico molecular, o especialista libera-se em parte da rotina de identificação de espécies já bem caracterizadas e pode dedicar-se a trabalhos mais específicos, por exemplo, a identificação de novas espécies.

No momento, não há relato de fragmentos de DNA que sejam marcadores específicos para o *R. reniformis*. Contudo, tendo por base outras espécies de fitonematóides (CARNEIRO et al., 2000, 2005; PETERSEN et al., 1997; SUBBOTIN et al., 2000; MACHADO et al., 2007), é possível buscar sua identificação em nível molecular por meio de isoenzimas, amplificação de fragmentos específicos a regiões de rDNA ou por PCR-RFLP. A utilização da PCR, em especial, é promissora considerando que essa metodologia é rápida, sensível e de relativo custo baixo.

Este trabalho teve o objetivo de identificar oligonucleotídeos capazes de amplificar fragmentos potencialmente específicos para o nematóide *R. reniformis* em amostras de DNA monoespecífico ou de DNA total de nematóides em solo infestado (amostras-teste).

Material e Métodos

Nematóides – As amostras da espécie *R. reniformis* foram obtidas por multiplicação em plantas hospedeiras de soja, cultivadas em solo esterilizado e adubado sob condições de casa de vegetação, com base em inóculo obtido nos campos experimentais da Embrapa Cerrados. Após completa infestação, as raízes das plantas parasitadas foram lavadas e delas foram retiradas massas de ovos. As massas de ovos foram colocadas para eclodir, segundo a técnica descrita por Sharma (1985), e os juvenis de segundo estágio foram coletados, contados em câmara de Peters e utilizados na extração do DNA. Os nematóides totais presentes em amostras de solo infestado também foram extraídos, segundo a técnica descrita por Jenkins (1964), contados e utilizados para extrair o DNA. Essas amostras foram consideradas amostras-teste. Foram analisadas amostras monoespecíficas e de solo-teste infestado com somente uma população do nematóide. Como controle, também foram utilizadas amostras de nematóides de vida livre, que representaram amostras de solo não-infestado com nematóides fitoparasitas.

Extração do DNA dos nematóides – o DNA dos juvenis de segundo estágio das amostras de *R. reniformis* foi extraído segundo a técnica descrita por Blacke et al. (1992) e Fallas et al. (1996), com modificações. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e analisado quanto a sua integridade em reações de RAPD.

Amplificação e análise de fragmentos específicos – Fragmentos potencialmente específicos para *R. reniformis* foram obtidos por meio de oligonucleotídeos desenhados a partir da seleção de seqüências

de genes específicas descritas e depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Por questões referentes à possibilidade de proteção da tecnologia, as seqüências dos oligonucleotídeos não são apresentadas. Os oligonucleotídeos foram utilizados em reação de PCR. As amplificações foram efetuadas em termociclador (MJRes.), programado para 45 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 51 °C ou 60 °C e 2 minutos a 72 °C. Antes dos 45 ciclos, foi realizada uma etapa de desnaturação do DNA por 3 minutos a 94 °C e, após os 45 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após a amplificação, os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 2 % em TBE (Tris-Borato 100 mM; pH 8,3; EDTA 2 mM) com brometo de etídio (0,5 µg/ml) (SAMBROOK et al., 1989). Cada amostra analisada em PCR continha 40 ng de DNA total; 1,5 mM ou 2 mM de MgCl₂, conforme recomendação do fabricante da Taq polimerase; 0,25 µM de cada oligonucleotídeos; 1 U de Taq polimerase em tampão apropriado. Amostras de DNA de nematóides de vida livre foram utilizadas como controle. A sensibilidade do método de amplificação dos fragmentos específicos foi analisada tomando-se amostras de DNA com concentrações diferentes e identificando o nível de detecção obtido para cada em gel de agarose.

Resultados e Discussão

Foram desenhados três pares de oligonucleotídeos específicos para rDNA de *R. reniformis* com base nas seqüências presentes em banco de dados. Na Tabela 1, é apresentada a temperatura de anelamento utilizada na amplificação e o tamanho dos fragmentos gerados com esses pares de oligonucleotídeos. Foi verificado que todos os pares de oligonucleotídeos desenhados foram capazes de amplificar o material genético de *R. reniformis*. Nas Fig. 1, 2 e 3, é possível observar os fragmentos específicos potencialmente capazes de identificar o *R. reniformis* em amostras mono específicas e de solo-teste infestado. O par de oligonucleotídeos 1 (Fig. 1) foi capaz também de discriminar amostras de *Pratylenchus brachyurus* pelo fato de gerar um fragmento

específico, reprodutível e distinguível para essa segunda espécie. Essa amplificação não causa confundimento entre as espécies de *Rotylenchulus* e *Pratylenchus*, pois os fragmentos amplificados são bem distinguíveis em gel de agarose a 2 %. Esse resultado é muito interessante pelo fato de um mesmo par de oligonucleotídeos poder diferenciar ao mesmo tempo duas espécies de nematóides que estejam na mesma amostra. Os demais pares amplificaram somente as amostras de *R. reniformis* (Fig. 2 e 3), não sendo observadas amplificações nas amostras de *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. e *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, nem em amostras de nematóides de vida livre.

A especificidade dessa identificação pode ser atribuída às seqüências dos oligonucleotídeos desenhadas, à temperatura alta de anelamento utilizada na amplificação e a não-amplificação em amostra de DNA de outras espécies e de nematóides de vida livre. A reprodutibilidade foi confirmada em análises de mais de uma amostra de DNA de uma população e amostras de solo-teste infestado. Todos os resultados foram reproduzidos intra e interamostras. No entanto, é importante a realização de um teste de validação com 10 a 30 populações diferentes do *R. reniformis* para que seja descartada qualquer variabilidade genética interpopulações que possa inviabilizar o diagnóstico de diversas áreas infestadas.

Tabela 1. Relação de oligonucleotídeos desenhados e resultados obtidos para o *R. reniformis*.

Par de oligonucleotídeos*	Temperatura de Anelamento (°C)	Tamanho Aproximado do Fragmento amplificado (pB)	Especificidade
1	60	~650	<i>R. reniformis</i>
2	60	~400	<i>R. reniformis</i>
3	51	~350	<i>R. reniformis</i>

* Por questões referentes à possibilidade de proteção da tecnologia, as seqüências dos oligonucleotídeos não foram apresentadas.

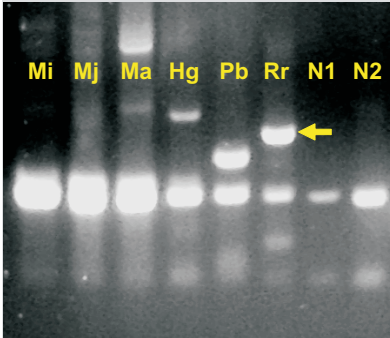


Fig. 1. Análise eletroforética em gel de agarose 2 % demonstrando a amplificação específica com o par de oligonucleotídeos 1. A seta indica o fragmento F1, específico para o *R. reniformis*. Mi - *Meloidogyne incognita*; Mj - *M. javanica*; Ma - *M. arenaria*; Hg - *H. glycines*; Pb - *P. brachyurus*; Rr - *R. reniformis*; N1 e N2 - amostras de nematóides de vida livre.

Fig. 2. Análise eletroforética em gel de agarose 2 % demonstrando a amplificação específica com o par de oligonucleotídeos 2. A seta indica o fragmento F2, específico para o *R. reniformis*. Mi - *Meloidogyne incognita*; Mj - *M. javanica*; Ma - *M. arenaria*; Hg - *H. glycines*; Pb - *P. brachyurus*; Rr - *R. reniformis*; N1 e N2 - amostras de nematóides de vida livre; PM - marcador de peso molecular 1 KB.

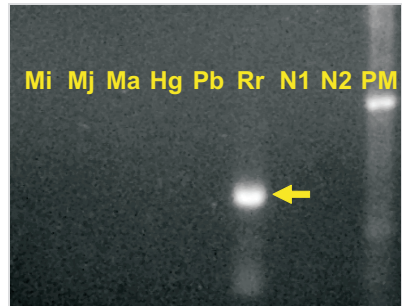
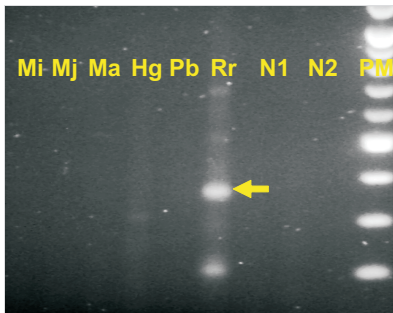


Fig. 3. Análise eletroforética em gel de agarose 2 % demonstrando a amplificação específica com o par de oligonucleotídeos 3. A seta indica o fragmento F3, específico para o *R. reniformis*. Mi - *Meloidogyne incognita*; Mj - *M. javanica*; Ma - *M. arenaria*; Hg - *H. glycines*; Pb - *P. brachyurus*; Rr - *R. reniformis*; N1 e N2 - amostras de nematóides de vida livre; PM - marcador de peso molecular 50 pB.



No que se refere à sensibilidade do método diagnóstico descrito neste trabalho, pode-se informar que esses fragmentos também foram testados com respeito ao nível de detecção. Esses resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Estudo dos fragmentos com potencial para identificar especificamente o *R. reniformis*.

Frag- mento	Nível de Detecção (ng)	Amostras-teste					
		R1		R2		R3	
		Quant. (ng)	Detec- ção	Quant. (ng)	Detec- ção	Quant. (ng)	Detec- ção
1	10/1	2,3	+	3,2	+	36	+
2	1/0,1	2,3	+	3,2	+	36	+
3	40	2,3	-	3,2	-	36	+

Nesse caso, observou-se que os fragmentos selecionados têm níveis de detecção diferentes. O F2 é aquele que pôde ser amplificado em amostras que continham um número menor de nematóides (nível de detecção 1/0,1 ng) e o F3, no entanto, é aquele que somente é detectado em amostras que contenham grande quantidade de DNA do nematóide (nível de detecção 40 ng). O F1 é detectado em amostras com uma quantidade intermediária entre F2 e F3 (nível de detecção 10 ng). Essas diferenças auxiliam o estabelecimento de um parâmetro que objetiva estabelecer uma relação quantitativa entre a identificação molecular e a do número de nematóides no solo infestado. As diferenças de nível de detecção podem ser explicadas de duas maneiras: ou a seqüência gênica é mais abundante no genoma ou a temperatura de anelamento utilizada favorece mais os oligonucleotídeos, aumentando a eficiência da amplificação.

Tendo a reação de PCR utilizado uma concentração inicial de DNA total de 40 ng, essa quantidade pode ser relacionada com 100 % de nematóides na amostra de nematóides monoespecíficos; concentrações de 10 ng e 1 ng podem ser relacionadas com 25 % e 0,25 %, respectivamente. Nas amostras de solo-teste infestado, existem exemplares de fitonematóides e nematóides de vida livre (amostras heterogêneas). Dessa maneira, é possível relacionar a concentração

do fragmento amplificado com o número de nematóides totais no solo, se obtivermos uma quantificação de nematóides totais do mesmo. Essa quantificação pode ser bastante acurada com a utilização da PCR quantitativa (qPCR), que é uma técnica bastante precisa para avaliar a concentração do fragmento amplificado. Dessa forma, o diagnóstico molecular para *R. reniformis* proposto neste trabalho pode cumprir dois requisitos importantes: o qualitativo e o quantitativo, desde que seja realizada a validação.

Os F1, F2 e F3 também foram capazes de ser amplificados e identificarem o nematóide em amostras-teste de solo infestado (Tabela 2). Nesse caso, foi observado que essa detecção obedeceu ao nível de detecção observado. Isto é, o F3 somente foi amplificado na amostra que continha um número maior de nematóides (R3) e os fragmentos F1 e F2 foram amplificados em todas as amostras, sendo que o reconhecimento do F2 foi mais sensível do que o do F1 (Fig. 4 e 5).

Na Fig. 4A, pode ser observado que o par de oligonucleotídeos 1 amplifica um fragmento reprodutível para o *R. reniformis* em amostras de solo-teste infestado.

Na Fig. 4B, pode ser observado que o par de oligonucleotídeos 2 não amplificou nenhum fragmento em amostra de solo-teste infestado com espécies de *Meloidogyne incognita* e amostras de nematóides de vida livre. Na Fig. 4C, o mesmo par de oligonucleotídeos também não amplificou nenhum fragmento em amostras de solo-teste infestado com *Heterodera glycines*. Esses resultados também são verdadeiros para os demais oligonucleotídeos, apesar de não serem mostrados.

Na Fig. 5, pode ser observado também o reconhecimento do oligonucleotídeos 3 em três amostras diferentes de DNA de solo-teste infestado, ressaltando o reconhecimento da amostra-teste R3, a única detectada.

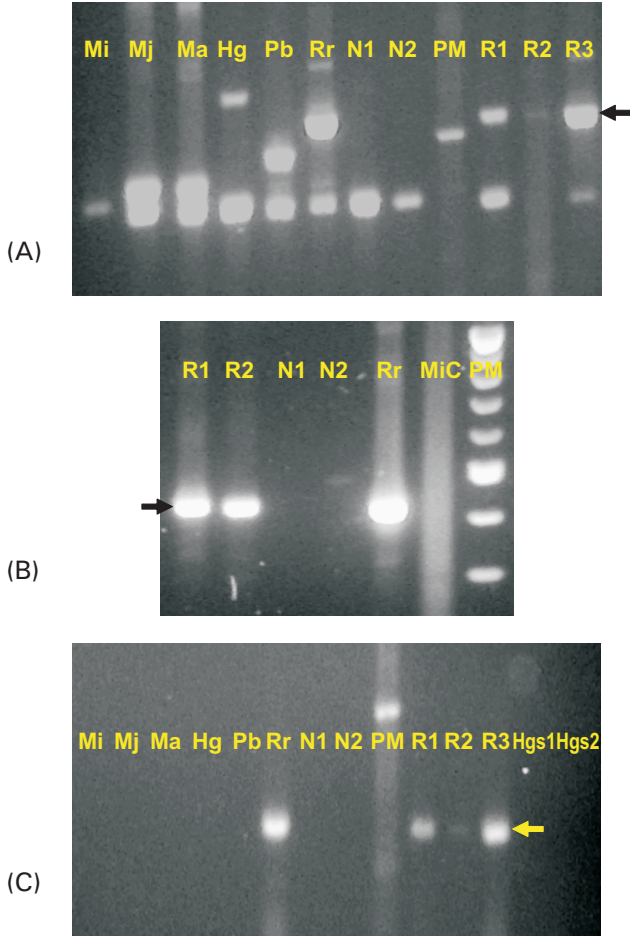


Fig. 4. Análise eletroforética em gel de agarose 2 % demonstrando a amplificação específica com os pares de oligonucleotídeos 1 e 2 em amostras monoespecíficas e de solo-teste infestado. As setas indicam os fragmentos F1 e F2, específicos para o *R. reniformis*. Identificação específica com o par de oligonucleotídeos 1 (A); identificação específica com o par de oligonucleotídeos 2 (B); Mi - *Meloidogyne incognita*; Mj - *M. javanica*; Ma - *M. arenaria*; Hg - *H. glycines*; Pb - *P. brachyurus*; Rr - *R. reniformis*; N1 e N2 - amostras de nematóides de vida livre; R1, R2, R3 - amostras de solo-teste infestado com *R. reniformis*; Mi2 - amostra de solo-teste infestado com *Meloidogyne incognita*; Hgs1, Hgs2 - amostras de solo-teste infestado com *H. glycines*; PM - marcador de peso molecular 100 pB (C).

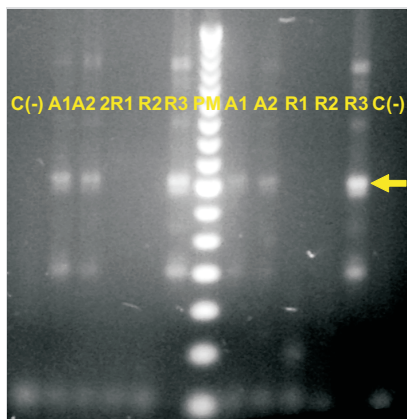


Fig. 5. Análise eletroforética em gel de agarose 2 % demonstrando a amplificação específica com o par de oligonucleotídeos 3 em amostras de solo-teste infestado com *R. reniformis*. A seta indica o fragmento F3, específico para o *R. reniformis*. A1, A2 - amostras puras de DNA de *R. reniformis*; R1, R2, R3 - amostras de solo-teste infestado com *R. reniformis*; C (-) - controle negativo; PM - marcador de peso molecular 50 pB.

Este trabalho apresenta o primeiro relato para um diagnóstico molecular de *R. reniformis*. Com a validação desse diagnóstico, será possível identificar, de forma específica, o nematóide reniforme em amostras monoespecíficas e de solo infestado. Esse diagnóstico será uma ferramenta importante, que pode auxiliar a diagnose e o manejo em áreas infestadas, bem como os trabalhos quarentenários.

Conclusões

O trabalho selecionou três pares de oligonucleotídeos capazes de amplificar em reação de PCR fragmentos de DNA reprodutíveis e potencialmente específicos para o *R. reniformis*.

O trabalho observou que os fragmentos de DNA amplificados apresentam níveis de detecção diferentes. Esse resultado pode ser aprimorado em qPCR, contribuindo para um diagnóstico quantitativo do nematóide em amostras de solo infestado.

O trabalho representa o primeiro relato para um diagnóstico molecular do nematóide *R. reniformis*.

Referências

ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. Manejo de nematóides. In: FREIRE, E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado Brasileiro**. Brasília, DF: Abrapa, 2007. cap. 15. p. 551-580.

ASMUS, G. L.; RODRIGUES, E.; ISENBERG, K. Danos em soja e algodão associados ao nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) em Mato Grosso do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 24., 2003, Petrolina. **Programa e resumos...** Petrolina: Sociedade Brasileira de Nematologia: Embrapa Semi-Árido, 2003.

BLACKE, M. C.; DUREAU, N. M.; PUTERKA, G. J.; NECHOLS, J. R.; PETTORINI, J. M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homóptera:Aphididae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 82, p. 151-159, 1992.

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

CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex PCR. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 233-242, 2005.

FALLAS, G. A.; HAHN, M. L.; FARGETTE, M.; BURROWS, P. R.; SARAH, J-L. Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus* spp. from different areas of the world. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 422-430, 1996.

JATALA, P. Reniform and false root-knot nematodes, *Rotylenchulus* and *Nacobbus* spp. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap. 11, p. 509-528.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1988. 197 p.

MACHADO, A. C. Z.; FERRAZ, L. C. C. B.; OLIVEIRA, C. M. G. Development of a species-specific reverse primer for the molecular diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. **Nematropica**, v. 37, p. 249-257, 2007.

PETERSEN, D. J.; ZIJLSTRA, C.; WISHART, J.; BLOK, V.; VRAIN, T. C. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequences in the ribosomal intergenic spacer. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 20, n. 6, p. 619-626, 1997.

ROBINSON, A. F.; INSERRA, R. N.; CASWELL-CHEN, E. P.; VOVLAS, N.; TROCCHI, A. *Rotylenchulus* species: identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. **Nematropica**, Auburn, v. 27, n. 2, p. 127-180, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SHARMA, R. D. Comparação de métodos para coletar ovos de *Meloidogyne* spp. de raízes, incluindo uma nova técnica. **Nematologia Brasileira**, v. 9, p. 18-19, 1985.

SUBBOTIN, S. A.; WAYENBERGE, L.; MOENS, M. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda:Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. **Nematology**, v. 2, p. 153-164, 2000.

TORRES, G. R. C.; PEDROSA, E. M. R.; MOURA, R. M.; REHN, V. N. C.; SALES JUNIOR, R. Estudo morfológico, fisiológico e enzimático de uma população de *Rotylenchulus reniformis* associada a *Cucumis melo*. **Caatinga**, Mossoró, v. 19, p. 350-359, 2006.