

**Identificação Molecular
de Nematóides de Galhas,
Meloidogyne ssp.**



ISSN 1676-918X

Setembro, 2008

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 219

Identificação Molecular de Nematóides de Galhas, *Meloidogyne* spp.

*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 Vidigal Cabral de Miranda*

Equipe de revisão: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*

Francisca Elijani do Nascimento

Jussara Flores de Oliveira Arbues

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares Araújo*

Editoração eletrônica: *Renato Berlim Fonseca*

Capa: *Renato Berlim Fonseca*

Foto da Capa: *Guilherme Asmus*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Alexandre Moreira 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**

-
- 119 Identificação molecular do nematóide de galhas, *Meloidogyne* ssp.
/ Maria Cristina Cordeiro... [et al.]. — Planaltina, DF : Embrapa
Cerrados, 2008.
20 p. — (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa
Cerrados, ISSN 1676-918X ; 219).

1.Nematóide. 2. Identificação Molecular. I. Cordeiro, Maria
Cristina Rocha. II. Série.

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	10
Conclusões	18
Referências	18

Identificação Molecular de Nematóides de Galhas, *Meloidogyne* spp.

*Maria Cristina Rocha Cordeiro*¹; *Alexandre Moura Cintra Goulart*²; *Ana Maria Costa*³; *Ravi Datt Sharma*⁴

Resumo

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. são fitoparasitas que parasitam espécies de importância agrônômica distribuídas em zonas tropicais e temperadas, representados por cerca de 90 espécies e diferentes biótipos. Na região do Cerrado do Brasil, foram observadas majoritariamente três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. As diferentes espécies de *Meloidogyne* podem ser caracterizadas por parâmetros morfológicos e moleculares. Atualmente, a melhor caracterização de diferentes espécies desse gênero faz-se pelo polimorfismo das esterases de fêmeas. A dependência do estágio de seu desenvolvimento conduz às alternativas de identificação pelo DNA, especialmente utilizando-se da técnica do PCR. Oligonucleotídeos específicos foram desenhados com o objetivo de identificar em PCR as diferentes espécies de *Meloidogyne* que ocorrem em solos do Cerrado do Brasil. Foram obtidos potencialmente seis fragmentos gênero específico, um fragmento apenas reconhecendo *M. javanica* e *M. arenaria* e outro *M. javanica*. Este trabalho representa mais uma iniciativa para identificar, especificamente em DNA, as diferentes espécies de *Meloidogynes* spp.

Termos para indexação: diagnóstico, PCR, solo.

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

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

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

⁴ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador aposentado da Embrapa Cerrados, dravidattsharma@hotmail.com

Root-knot Nematode *Meloidogyne* spp. Molecular Identification

Abstract

The genus Meloidogyne spp. are plant-parasites from agronomic important cultivars distributed around tropical and temperate zones represented by at least 90 species and different biotypes. In the Brazilian Savannah region were most observed three species as M. incognita, M. javanica and M. arenaria. The different Meloidogyne species are characterized based on morphological and molecular parameters. Actually, the best species characterization from the genera is based on the female estherases polymorphism. The stage dependence to this characterization led to an alternate identification through DNA specially using the PCR technique. Specific primers were designed with the objective to identify in PCR the different Meloidogyne species occuring on Brazilian Savannah soils. It was obtained potentially six fragments genera specific, one fragment only recognizing M. javanica and M. arenaria and, another one recognizing M. javanica. This work represents more one iniciative to identify at DNA level the different Meloidogynes species.

Index terms: diagnostic, PCR, soil.

Introdução

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. são importantes fitoparasitas de grande distribuição no mundo, obrigatórios em plantas monocotiledôneas, dicotiledôneas, anuais ou perenes. Podem parasitar espécies de importância agrônômica como grãos, frutas e plantas ornamentais. Esses nematóides reduzem a produção das plantas infectadas, afetando-as tanto em termos quantitativos, quanto qualitativos (EISENBACK; TRIANTAPHYLOU, 1991). No Brasil, esses nematóides são responsáveis por grandes perdas de produção em várias culturas, tais como tomateiro, soja, algodão, milho, cafeeiro, entre outras (COSTA MANSO; TENENTE, 1994).

Esse gênero é representado por um grande número de espécies (atualmente em torno de 90) e diferentes biótipos. Na região do Cerrado do Brasil, foram observadas majoritariamente três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (SOUZA et al., 1994; CARNEIRO et al., 2008).

As diferentes espécies de *Meloidogyne* podem ser caracterizadas por diversos parâmetros, tais como os caracteres morfológicos da perineal das fêmeas e da região anterior dos machos; o padrão de atividade isoenzimática ou por identificação molecular no DNA. Atualmente, a melhor caracterização das diferentes espécies do gênero *Meloidogyne* faz-se pelo polimorfismo das esterases de fêmeas (CARNEIRO et al., 2000), sendo esse parâmetro bastante confiável. No entanto, considerando que essa metodologia analisa a expressão de um único gene e se aplica apenas a fêmeas adultas, há o interesse em desenvolver metodologias moleculares que permitam a identificação do nematóide em todas as fases do ciclo. Utilizando-se o DNA, é possível a análise de vários genes concomitantemente, cuja identificação é estável em qualquer fase do desenvolvimento do nematóide. A metodologia do PCR é considerada uma boa alternativa para essa identificação, pois

é rápida e de baixo custo. Existem duas estratégias utilizadas: (a) seleção de marcadores do tipo SCAR (ZILSTRA et al., 2000; RANDIG et al. 2002; CARNEIRO et al., 2005); e (b) amplificação de um fragmento gênico espécie-específico.

Esse fragmento é, em geral, amplificado com o uso de oligonucleotídeos que reconhecem segmentos gênicos espécies-específicos, como as amplificações dos fragmentos do rDNA ou seqüências ITS com ou sem uma posterior digestão enzimática (PETERSEN; VRAIN, 1996; PETERSEN et al., 1997) e a amplificação de fragmentos específicos a outras seqüências gênicas. Em alguns casos (POWERS; HARRIS, 1993), a diferenciação de espécies foi conseguida, mas, na maioria desses estudos, os oligonucleotídeos não foram validados para um grande número de populações.

A validação em várias populações é muito importante para comprovar a especificidade dos oligonucleotídeos, considerando uma possível variabilidade genética interpopulações e permitindo uma maior confiabilidade da identificação específica.

O diagnóstico molecular no DNA desses fitonematóides representa uma vantagem, pois pode ser realizado por profissionais não especializados em taxonomia clássica, auxiliando na identificação do parasita em áreas infestadas e permitindo maior dedicação do profissional especializado a outros estudos, por exemplo, na identificação de novas espécies.

Este trabalho tem o objetivo de selecionar oligonucleotídeos específicos, com base nas seqüências gênicas diferentes de rDNA ou regiões de ITS, com potencial de identificar especificamente as diferentes espécies do gênero *Meloidogyne* que ocorrem em solos do Cerrado do Brasil.

Material e Métodos

Nematóides

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* foram multiplicados em plantas de tomateiro cultivadas em solo estéril sob condições de casa de vegetação, com base em inóculo fornecido pela UnB (*M. icognita* e *M. javanica*) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (*M. arenaria*). As raízes das plantas infectadas foram lavadas e delas retiradas massas de ovos que foram deixadas em câmara úmida, segundo a técnica descrita por Sharma (1985), e os juvenis de segundo estágio (J2) foram coletados, avaliados numericamente em câmara de Peters e utilizados para extrair o DNA. J2s extraídos de solo infestado pelo método de Coolen (1979) também foram utilizados para extrair o DNA (amostras-testes). Como controle, foram utilizadas também amostras contendo apenas nematóides de vida livre.

Extração do DNA dos nematóides

O DNA dos J2s foi extraído segundo as técnicas descritas 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

Os fragmentos, potencialmente específicos para as três espécies de nematóides estudadas, foram obtidos de pares de oligonucleotídeos desenhados com base na seleção de genes descritos e depositados em banco de dados da internet. Os oligonucleotídeos foram utilizados em reação de PCR. Cada amostra analisada em PCR continha 40 ng de DNA total; 1,5 μ M de MgCl₂ ou 2 μ M de MgCl₂, conforme recomendação do fabricante da Taq polimerase; 0,25 μ M de cada primer; 1 U de Taq polimerase em tampão apropriado. 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 μ M, pH 8,3; EDTA 2 μ M) e corados com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) (SAMBROOK et al., 1989). A sensibilidade do método de amplificação dos fragmentos potencialmente específicos foi analisada pelo nível de detecção obtido em amostras contendo diferentes concentrações de DNA de cada espécie, observado em gel de agarose corado com brometo de etídio.

Resultados e Discussão

Este trabalho selecionou seqüências gênicas espécie-específicas correspondentes a catepsinas, proteinases serínicas e proteínas das glândulas esofageais com base no banco de dados de genes (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nesse banco de dados, encontram-se disponíveis cerca de 30 mil seqüências gênicas para o *M. incognita*, 7.696 para o *M. javanica* e 8.220 para o *M. arenaria*. As seqüências foram selecionadas e analisadas utilizando-se o programa Clustal W com outras seqüências gênicas correspondentes a outros nematóides fitoparasitas. Com base nessa análise, os oligonucleotídeos foram desenhados conforme sua especificidade.

Na Tabela 1, podem ser observados os dados relativos aos 13 pares de oligonucleotídeos desenhados utilizados na PCR e os resultados obtidos.

Tabela 1. Relação de primers desenhados e resultados obtidos.

Pares de oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho aproximado do fragmento amplificado reprod. (pb)	Especificidade esperada	Especificidade obtida
1	60	~ 700	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Meloidogyne</i>
2	51	~ 500	<i>Meloidogyne arenaria</i>	<i>Meloidogyne</i>
3	60	~ 650	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Meloidogyne</i>
4	.	.	<i>Meloidogyne arenaria</i>	.
5	.	.	<i>Meloidogyne arenaria</i>	.
6	.	.	<i>Meloidogyne arenaria</i>	.
7	.	.	<i>Meloidogyne arenaria</i>	.
8	51	~ 500	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Meloidogyne</i>
9	51	~ 450, ~ 650	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>M.javanica e M.arenaria</i>
10	.	.	<i>Meloidogyne javanica</i>	.
11	51	~ 425	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Meloidogyne</i>
12	.	.	<i>Meloidogyne incognita</i>	.
13	51	~ 455	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Meloidogyne</i>

Obs.: por causa da possibilidade de proteção do teste diagnóstico, as seqüências dos oligonucleotídeos não estão apresentadas.

Dos 13 pares de oligonucleotídeos desenhados, 5 foram propostos para amplificar especificamente o *M. javanica*, 5 para o *M. arenaria* e 3 para o *M. incognita*. Em cerca de 50 % dos oligonucleotídeos desenhados e testados em PCR foi conseguida uma amplificação de um fragmento de forma reprodutível intra-amostra e interamostra analisada. Foram testadas duas amostras puras de uma mesma população, além de amostras testes. Porém, a maioria desses oligonucleotídeos amplificou igualmente nas amostras das três espécies de *Meloidogyne* estudadas, apenas diferenciando-as das espécies *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines*, também analisadas (Fig. 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Essas últimas espécies também foram analisadas porque são largamente encontradas em solos da região do Cerrado brasileiro. Dois fragmentos (F2 e F3) que amplificaram igualmente nas espécies de *Meloidogynes* foram analisados posteriormente à amplificação pela digestão com enzima de restrição Eco R1. Porém, não houve diferenças de padrão de fragmentos gerados nessa digestão que diferenciasses as espécies. Esse resultado demonstra que as diferentes espécies de *Meloidogyne* têm uma homologia gênica bastante alta e, por isso, é difícil a identificação no âmbito do DNA.

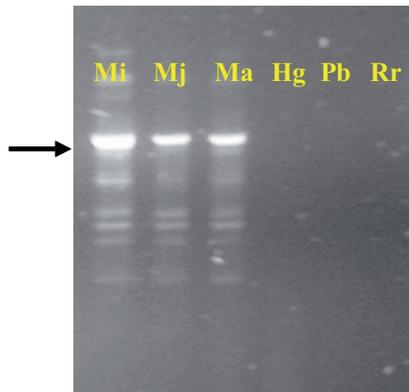


Fig. 1. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com a combinação de oligonucleotídeos 1. A seta indica o fragmento F1. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*.

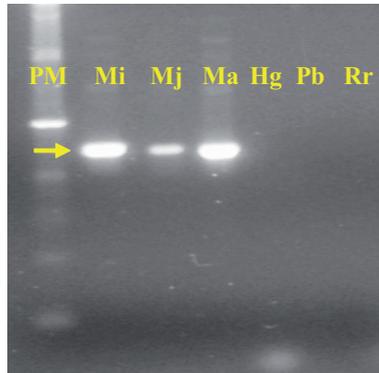


Fig. 2. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com a combinação de oligonucleotídeos 2. A seta indica o fragmento F2. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; PM- marcador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

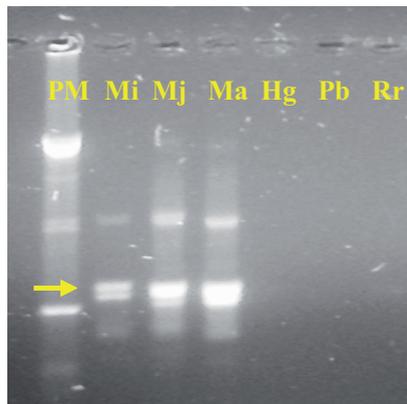


Fig. 3. Análise eletroforética em gel de agarose 2 % demonstrando a amplificação específica com a combinação de oligonucleotídeos 3. A seta indica o fragmento F3. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; PM- marcador de peso molecular 1KB.

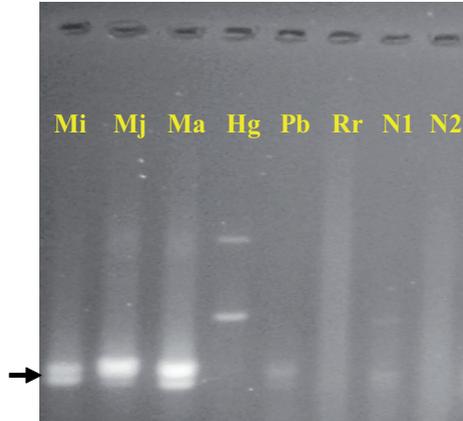


Fig. 4. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com a combinação de oligonucleotídeos 8. A seta indica o fragmento F8. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; N1, N2- amostras de DNA de nematóide de vida livre.

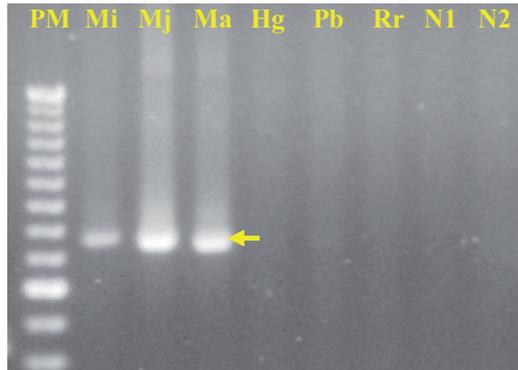


Fig. 5. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com a combinação de oligonucleotídeos 11. A seta indica o fragmento F11. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; N1, N2- amostras de DNA de nematóide de vida livre; PM- marcador de peso molecular 50 pB.

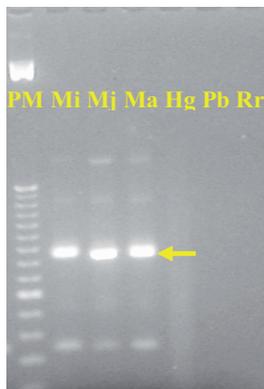


Fig. 6. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com a combinação de oligonucleotídeos 13. A seta indica o fragmento F13. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; PM- marcador de peso molecular 50 pB.

Apenas a combinação de oligonucleotídeos 9 amplificou nas amostras de *M.arenaria* e *M. javanica*, possibilitando distinguir um fragmento sempre presente (amostra pura e teste) somente na amostra de *M. javanica*, fragmento 10 (Fig. 7).

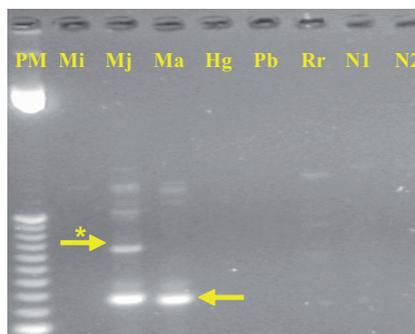


Fig. 7. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com a combinação de oligonucleotídeos 9. As setas indicam o fragmento F9 e o fragmento 10 (*). Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; N1, N2- amostras de DNA de nematóide de vida livre; PM- marcador de peso molecular 50 pB.

Esse resultado demonstra que essas duas espécies são possivelmente geneticamente mais relacionadas com respeito à espécie *M. incognita*. Esses últimos fragmentos têm o potencial de diferenciar *M. javanica* e *M. arenaria*.

Nenhum dos fragmentos selecionados foi amplificado em amostras com nematóide de vida livre. Esse resultado demonstra que eles têm o potencial para identificar o gênero *Meloidogyne* em solos infestados, descartando-se a presença desses nematóides bem como as outras três espécies que mais ocorrem nos solos do Cerrado como *P. brachyurus*, *R. reniformis* e *H. glycines*. Esse fato demonstra uma forte especificidade ao gênero *Meloidogyne*. Porém todos os fragmentos selecionados que podem representar marcadores específicos potenciais para o gêneros *Meloidogyne*, *M. javanica* ou *M. arenaria* devem ser validados em 10 a 30 populações diferentes para outras espécies, bem como, seqüenciados. A primeira validação descartará qualquer variabilidade gênica entre diferentes populações de outras espécies de *Meloidogyne*, e a última demonstrará que a combinação de oligonucleotídeos realmente amplifica a seqüência gênica esperada. O fragmento que foi observado somente em amostra de *M. javanica* e *M. arenaria* amplificou, também, em 10 populações diferentes de *M. arenaria*. O DNA das diferentes populações de *M. arenaria* ainda não foi capaz de amplificar o fragmento potencialmente identificador de *M. javanica*.

Uma outra estratégia visando a diferenciar as espécies de *Meloidogyne* que pode ser realizada é a análise em gel desnaturante em gradiente – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Essa técnica é eficiente para diferenciar fragmentos de DNA bacteriano e já foi apontada em estudos de diferenciação de gêneros de nematóides presentes no solo (FOUCHER; WILSON, 2002).

Os fragmentos selecionados também foram estudados quanto ao nível de detecção, bem como detecção em amostras testes. Esses resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Estudo dos fragmentos com potencial para identificar especificamente o gênero *Meloidogyne*, sensibilidade e detecção em amostras desconhecidas de solo contaminado.

Frag- mento	Nível de detecção (ng)	Amostras testes									
		Mi 1		Mi 2		Mj 1		Mj 2		Ma	
		Quant. (ng)	Det.	Quant. (ng)	Det.	Quant. (ng)	Det.	Quant. (ng)	Det.	Quant. (ng)	Det.
1	40/10	21,5	-	28,8	-	26	+	22	+	12,7	-
2	10	21,5	+	28,8	+	26	+	22	+	12,7	+
3	10	21,5	+	28,8	+	26	+	22	+	12,7	+
8	1/10(Ma)	21,5	+	28,8	+	26	+	22	+	12,7	+
9	1	21,5	-	28,8	-	26	+	22	+	12,7	+
11	10	21,5	+	28,8	+	26	+	22	+	12,7	+
13	10	21,5	+	28,8	+	26	+	22	+	12,7	+

Em geral, todos os oligonucleotídeos selecionados detectaram fragmentos em amostras que continham até 10 ng de DNA. Considerando-se que a amostra utilizada na PCR continha 40 ng de DNA genômico, 10 ng é equivalente a 25 % da amostra. Em alguns casos, foi alcançada uma detecção com até 1 ng de DNA, na amostra (0,25 %). Dessa forma, conhecendo-se o número total de nematóides presentes em um lavado de solo infestado, pode-se estimar a quantidade de nematóides pelo nível de detecção do fragmento amplificado. Esses dados devem ser validados. Foi observado, também, que os oligonucleotídeos selecionados foram capazes de amplificar o fragmento esperado em amostras de lavado de solo infestado cuja quantidade de nematóides em nanogramas equivalia à faixa do nível de detecção esperado. O F1 foi aquele em que os resultados foram os mais imprecisos, por isso essa combinação não foi considerada eficiente para esse tipo de análise. Essa estimativa pode ser mais acurada se esse nível de detecção for validado utilizando-se a PCR quantitativa (qPCR). Os

testes que determinam o nível de detecção realizado permitiram aferir à sensibilidade do método diagnóstico proposto. Se um oligonucleotídeo é capaz de amplificar um fragmento específico em uma amostra que contém apenas 25 % ou 0,25 % do DNA para aquela espécie na amostra de DNA total, esse resultado demonstra uma boa sensibilidade do método. Essa estimativa validada cumpre o objetivo de auxiliar o diagnóstico de áreas infestadas por fitonematóides, considerando seu controle com os quesitos de identificar qualitativamente e quantitativamente. Este trabalho de seleção de oligonucleotídeos específicos para o gênero *Meloidogyne*, baseado unicamente na reação de PCR, representa uma possibilidade de estabelecer um método diagnóstico em amostras de solo infestado que identifique o gênero de forma qualitativa e quantitativa e, assim, permita a orientar a percepção de dano em culturas de importância agrônômica, produzidas por fitonematóides, facilitando os estudos do nematologista.

Conclusões

Foram selecionadas aproximadamente 14 oligonucleotídeos que têm o potencial de identificar de forma qualitativa e quantitativa o gênero *Meloidogyne* em amostras de solo infestado.

Um dos oligonucleotídeos selecionado tem o potencial de identificar somente as espécies *M. javanica* e *M. arenaria* ou apenas *M. javanica*.

Ficou demonstrado que é possível a detecção do gênero *Meloidogynes* em amostras de lavado de solo infestado.

Referências

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.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; MARTINS, I.; SOUZA, J. F.; PIRES, A. Q.; TIGANO, M. S. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. e fungos nematófagos em hortaliças no Distrito Federal, Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 135-141, 2008.

COOLEN, W. A. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. And other nematodes from roots and soil. In: LAMBERTI, F.; TAYLOR, C. E. (Ed.). **Root-knot nematodes (Meloidogyne species): systematics, biology and control**. London: Academic Press, 1979. p. 317-329.

COSTA MANSO, E.; TENENTE, R. V. Extração e identificação de fitonematoides. **RAPP**, v. 3, p. 265-291, 1994.

EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLON, H. H. Root-knot nematodes : *Meloidogynes* species and races. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of Agricultural Nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap. 6, p. 191-274.

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.

FOUCHER, A.; WILSON, M. Development of a polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis technique to study nematode species biodiversity using the 18S rDNA genes. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 45-48, 2002.

PETERSEN, D. J.; VRAIN, T. C. Rapid identification of *Meloidogyne* chitwoodi, M. Hapla and M. Falax using PCR primers to amplify their ribosomal intergenic spacer. **Fundam. Appl. Nematology**, v. 19, n. 6, p. 601-605, 1996.

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. **Fundam. Appl. Nematology**, v. 20, n. 6, p. 619-626, 1997.

POWERS, T. O.; HARRIS, T. S. A Polymerase Chain Reaction Method for Identification of Five Major *Meloidogyne* Species. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 1993.

RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. **Genome**, v. 45, p. 862-870, 2002.

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

SOUZA, R. M.; DOLINSKI, C. M.; HUANG, S. P. Survey of *Meloidogyne* spp. in native cerrado of Distrito Federal, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 463-465, 1994.

ZIJLSTRA, C. ; DONKERS-VENNE, D. T. H. M. ; FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified regions (SCAR) based PCR assays. **Nematology**, v. 2, p. 847-853, 2000.