

TIAGO GARCIA DA CUNHA

**DISTRIBUIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO NEMATOIDE-DE-GALHAS NA
CULTURA DA CENOURA EM MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa –
Campus Rio Paranaíba, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia - Produção
Vegetal, para a obtenção do título de
Magister Scientiae.

RIO PARANAÍBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca UFV - Campus de Rio Paranaíba**

T

C972d
2017

Cunha, Tiago Garcia da, 1984-

Distribuição e identificação do nematoide-de-galhas na cultura da cenoura em Minas Gerais / Tiago Garcia da Cunha. – Rio Paranaíba, MG, 2017.

viii, 68f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Liliane Evangelista Visôto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Meloidogyne*. 2. Esterase. 3. PCR. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Mestrado em Agronomia-Produção Vegetal (campus CRP). II. Título.

635.13

TIAGO GARCIA DA CUNHA

**DISTRIBUIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO NEMATOIDE-DE-GALHAS NA
CULTURA DA CENOURA EM MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa –
Campus Rio Paranaíba, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia - Produção
Vegetal, para a obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 01 de março de 2017.



Pedro Ivo Vieira God Good



Vinícius Ribeiro Faria



Everaldo Antônio Lopes
(Coorientador)



Liliane Evangelista Visotto
(Orientadora)

*Dedico aos meus pais Otacílio e Selma,
meus irmãos e minha noiva.*

AGRADECIMENTOS

À minha família por tudo que dedicou e me oportunizou durante toda a vida e por toda sua compreensão nos momentos de preocupação e ansiedade dessa jornada.

Aos meus amigos fraternos Júnio, Rodrigo, Edson e Edson Silva que sempre me acompanham e muito me incentivam com sua amizade.

Ao especial amigo Vinícius, que foi quem abriu as portas dessa oportunidade e quem tanto colaborou ao longo desse percurso para essa conquista.

Aos colegas do IFMG Lívia, Maísa, Ludmila que se desdobraram para que eu pudesse conciliar as atividades junto ao IFMG e ao curso de mestrado.

À Direção atual do IFMG *Campus* Bambuí que viabilizou essa conciliação das duas atividades.

À Universidade Federal de Viçosa à qual retornei para a obtenção de mais um título.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal, uma grande oportunidade de capacitação para nossa região.

À Comissão Orientadora, nominalmente, Prof^a. Liliane Evangelista Visôto, Prof. Everaldo Antônio Lopes e Prof^a. Danielle Ribeiro de Barros por sua paciência, dedicação e, principalmente, confiança e oportunidade.

Aos membros da banca, Prof. Pedro Ivo e Prof. Vinícius Faria por sua disponibilidade em participar e por suas contribuições que muito engrandeceram o trabalho.

Aos produtores que nos acolheram em suas propriedades e viabilizaram a pesquisa.

Às empresas parceiras que colaboram diretamente para o alcance dessa meta.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Tiago Garcia da Cunha, filho de Otacílio Inácio da Cunha e Selma Inêz Garcia Cunha, nasceu em Bambuí, no Estado de Minas Gerais, no dia 27 de março de 1984.

Em março de 2002, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se em agosto de 2007.

Em março de 2015, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba.

Atualmente, é servidor do Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* Bambuí.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO I- MÉTODOS DIAGNÓSTICOS USADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE NEMATÓIDE-DE-GALHAS.....	5
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	9
1.1. Método baseado em morfologia: observação dos caracteres morfológicos dos machos.....	9
1.2. Método baseado em morfologia: observação do padrão perineal de fêmeas.....	11
1.3. Método bioquímico: eletroforese de isoenzimas.....	12
1.4. Métodos moleculares.....	16
1.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
1.4.1.1. Multiplex PCR (PCR multiplex).....	21
1.4.1.2. Random amplified polimorphic DNA (RAPD).....	22
1.4.1.3. Sequence-characterized amplified region (SCAR).....	22
1.4.1.4. Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....	23
1.4.1.5. Microssatélites.....	23
1.4.1.6. PCR em tempo real (Real-Time PCR).....	24
1.4.1.7. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).....	26
1.4.2. Sequenciamento.....	28
1.4.3. Microarranjos de DNA.....	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO II- IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Meloidogyne</i> NA CULTURA DA CENOURA NAS TRÊS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS.....	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49

2.1. Coleta das populações do nematoide-degalhas.....	49
2.2. Extração, multiplicação e manutenção dos inóculos.....	50
2.3. Identificação das espécies de <i>Meloidogyne</i>	51
2.3.1. Identificação por morfologia da região perineal.....	51
2.3.2. Identificação por eletroforese de isoenzimas.....	51
2.3.3. Identificação por PCR e primers SCAR.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4. CONCLUSÃO.....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CONCLUSÕES GERAIS.....	68

RESUMO

CUNHA, Tiago Garcia da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Distribuição e identificação do nematoide-de-galhas na cultura da cenoura em Minas Gerais.** Orientadora: Liliane Evangelista Visôto. Coorientadores: Everaldo Antônio Lopes e Danielle Ribeiro de Barros.

A cenoura (*Daucus carota*) é cultivada em várias regiões do Brasil, incluindo Minas Gerais. O estado possui três pólos principais de produção: Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro e Campos das Vertentes. O nematoide-de-galhas do gênero *Meloidogyne* está entre os fatores mais importantes na redução de produção de diversas culturas, e a identificação acurada desses fitopatógenos é fundamental para o sucesso das práticas de manejo. Diferentes metodologias são usadas para a diagnose do nematoide-de-galhas. A análise do padrão perineal de fêmeas foi a principal técnica de identificação de espécies de *Meloidogyne* por vários anos, sendo complementada, a partir da década de 70 e 80, pela técnica de eletroforese de isoenzimas. Atualmente, as técnicas moleculares vêm sendo cada vez mais usadas para diagnose desses patógenos, com diversos protocolos e sequências de DNA disponíveis. Apesar da importância do nematoide-de-galhas para a cultura da cenoura, não há nenhum levantamento sistemático de ocorrência e distribuição do patógeno nessa cultura no estado de Minas Gerais. Mediante ao exposto, o presente trabalho objetivou caracterizar, através de técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares, as principais espécies de *Meloidogyne* presentes em áreas de cultivo de cenoura em Minas Gerais. Amostras de raízes e solo foram coletadas em áreas infestadas por *Meloidogyne* spp. na regiões do Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro e Campo das Vertentes. A identificação das espécies foi realizada por análise do padrão perineal, eletroforese de isoenzimas e por PCR com *primers* SCAR específicos. As espécies encontradas foram *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne polycephannulata*. *M. incognita* foi a espécie mais frequente, ocorrendo em 9 amostras (60%), seguida de *M. javanica* (26,6%). *M. incognita* foi identificado em amostras provenientes das três regiões, enquanto *M. javanica* em amostras do Alto Paranaíba e Campo das Vertentes. No Alto Paranaíba foi identificada também uma população de *Meloidogyne polycephannulata*.

ABSTRACT

CUNHA, Tiago Garcia da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Distribution and identification of root-knot nematode in carrot crops in Minas Gerais.** Advisor: Liliane Evangelista Visôto. Co-advisors: Everaldo Antônio Lopes and Danielle Ribeiro de Barros.

Carrots (*Daucus carota*) are grown in different regions of Brazil, including Minas Gerais. The state has three main production poles: Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro and Campos das Vertentes. The root-knot nematode of the genus *Meloidogyne* is among the most important factors in the reduction of production of several crops, and the accurate identification of these phytopathogen is fundamental for the success of the management practices. Different methodologies are used for the diagnosis of the root-knot nematode. The analysis of the perineal pattern of females was the main technique of identification of *Meloidogyne* species for several years, being complemented, from the decade of 70 and 80, by the technique of electrophoresis of isoenzymes. Currently, molecular techniques have been increasingly used for the diagnosis of these pathogens, with several protocols and available DNA sequences. Despite the importance of root-knot nematode for carrot culture, there is no systematic study of the occurrence and distribution of the pathogen in this crop in the state of Minas Gerais. The present work aimed to characterize, through morphological, biochemical and molecular techniques, the main species of *Meloidogyne* present in areas of carrot cultivation in Minas Gerais. Root and soil samples were collected in areas infested by *Meloidogyne* spp. in the regions of Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro and Campo das Vertentes. The identification of the species was performed by perineal pattern analysis, isoenzyme electrophoresis and by PCR with specific SCAR primers. The species found were *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne polycephannulata*. *M. incognita* was the most frequent species, occurring in 9 samples (60%), followed by *M. javanica* (26.6%). *M. incognita* was identified in samples from the three regions, while *M. javanica* in samples from Alto Paranaíba and Campo das Vertentes. In Alto Paranaíba a population of *Meloidogyne polycephannulata* was also identified.

INTRODUÇÃO GERAL

A cenoura (*Daucus carota*) é uma hortaliça da família *Apiacea*, apreciada *in natura* e em alimentos processados pela indústria. A produção de cenouras é estimada em 750 mil toneladas por ano, cultivada em mais de 20 mil ha, com os principais estados produtores: Bahia, Minas Gerais, Paraná e São Paulo (VILELA & BORGES, 2008). Em Minas Gerais, os pólos produtores são Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro e Campo das Vertentes.

Inúmeros fatores influenciam a redução da produtividade da cultura da cenoura, com destaque para os nematoides (LOPES et al., 2008). No Brasil, alguns dos problemas mais significativos são resultantes do ataque dos nematoides-de-galhas, do gênero *Meloidogyne* (PINHEIRO et al., 2010). O desenvolvimento da doença se dá com a colonização da região do córtex da raiz, levando à hipertrofia e hiperplasia de células e causando as galhas (PINHEIRO et al., 2010). Células gigantes e diversas alterações morfológicas, bioquímicas e anatômicas se desenvolvem (SIDDIQUI et al., 2014; BALDACCI-CRESP et al., 2015). Todas essas modificações levam à obstrução dos feixes vasculares, impedindo o fluxo normal de fotoassimilados, água e nutriente, prejudicando o desenvolvimento da planta (SIDDIQUI et al., 2014). A deformação das raízes é sintoma comum, incluindo subcrescimento, bifurcação e alteração visual devido à formação de galhas. Com isso, as raízes não atendem a padrões comerciais de classificação e são descartadas (PINHEIRO & HENZ, 2008; Pinheiro et al., 2010).

A associação de condições ambientais predominantes nas principais áreas de cultivo e a suscetibilidade de cultivares favorece a ocorrência da meloidoginose (VILELA & BORGES, 2008). O manejo do patógeno requer o uso integrado de várias estratégias, incluindo práticas culturais, cultivares resistentes, controle biológico e tratamento químico do solo (PINHEIRO et al., 2010). Entretanto, o êxito do manejo depende da identificação da espécie do nematoide e da determinação da densidade populacional no solo (MITKOWSKI & ABAWI, 2003).

Para a identificação de espécies de *Meloidogyne*, diversas técnicas têm sido usadas ao longo das últimas décadas. A observação dos padrões perineais foi o método padrão de identificação por muito tempo (HARTMAN & SASSER,

1985). No entanto, os padrões perineais de algumas espécies são similares e dificultam a acurácia no diagnóstico. A eletroforese de isoenzimas passou então a ser a técnica padrão de diagnose de espécies de *Meloidogyne* (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLOU, 1990; CARNEIRO & ALMEIDA, 2001). Atualmente, inúmeros métodos moleculares foram desenvolvidos e, com a redução dos custos dos equipamentos e dos reagentes, tendem a se tornar cada vez mais populares em procedimentos de rotina (HAN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2011; AKYASI & FELECK, 2013; HUMPHREYS-PEREIRA & ELLING, 2014).

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo que no primeiro capítulo, as principais técnicas de identificação de espécies de *Meloidogyne* serão relatadas, bem como as vantagens e limitações das mesmas. Em seguida, no capítulo 2, serão apresentados os resultados do levantamento das principais espécies de *Meloidogyne* encontradas em áreas de cultivo de cenoura em diferentes regiões produtoras do estado de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKYAZI, F.; FELEK, A.F. Molecular identification of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* from kiwi fruit orchards in Ordu province, Turkey. **Turkiye Entomoloji Dergisi**, v.37, n.4, p.449-456, 2013.
- BALDACCI-CRESP, F.; MAUCOURT, M.; DEBORDE, C.; PIERRE, O.; MOING, A.; BROUQUISSE, R.; FAVERY, B.; FRENDON, P. Maturation of nematode-induced galls in *Medicago truncatula* is related to water status and primary metabolism modifications. **Plant Science**, v.232, p.77-85, 2015.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzima dos nematoides de galha para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, p.35-44, 2001.
- ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v.22, p.10-15, 1990.
- HAN, H.; CHO, M.R.; JEON, H.Y.; LIM, C.K.; JANG, H.I. PCR-RFLP Identification of three major *Meloidogyne* species in Korea. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.7, n.2, p.171-175, 2004.
- HARTMAN, R.M.; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Vol. 2. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985, p.69-77.
- HUMPHREYS-PEREIRA, D.A.; ELLING, A.A. Mitochondrial genomes of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. incognita* (Nematoda: Tylenchina): comparative analysis, gene order and phylogenetic relationships with other nematodes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.194, p.20-32, 2014.
- LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CHARCHAR, J.M. 2008. Cenoura (*Daucus carota*) in: **Sistema de Produção, Embrapa Hortaliças**. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 19 abr 2016.

MITKOWSKI, N.A.; ABAWI, G.S. 2003. Nematóides de galhas. (Portuguese translation by E. A. Lopes, R. Dallemole-Giaretta, and B. S.Vieira, 2011). **The Plant Health Instructor**. DOI:10.1094/PHI-I-2011-03-29-01

OLIVEIRA, C.M.G.; MONTEIRO, A.R.; BLOK, V.C. Morphological and molecular diagnostics for plant parasitic nematodes: working together to get the identification done. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.65-73, 2011.

PINHEIRO, J.B.; HENZ, G.P. 2008. **Manejo do nematóide-de-galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura da cenoura**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 7p. (Comunicado Técnico 55).

PINHEIRO, J.B.; CARVALHO, A.D.F.; VIEIRA, J.V. 2010. **Manejo do nematóide-de-galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivos de cenoura na região de Irecê-BA**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 7p. (Comunicado Técnico 77).

SIDDIQUI, Y.; ALI, A.; NAIDU, Y. 2014. Histopathological changes induced by *Meloidogyne incognita* in some ornamental plants. **Crop Protection**, v.65, p.216-220.

VILELA, N.J.; BORGES, I.O. 2008. **Retrospectiva e situação atual da cenoura no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 9p. (Circular Técnica, 59).

CAPÍTULO I

Métodos diagnósticos usados na identificação de espécies de nematoídes-de-galhas

RESUMO

Nematoídes do gênero *Meloidogyne* são conhecidos como nematoíde-de-galhas e causam danos às principais culturas agrícolas de interesse comercial em todo o mundo. Mais de 100 espécies de *Meloidogyne* são conhecidas e uma mesma cultura pode hospedar várias espécies. A identificação acurada do patógeno é fundamental para seu manejo no campo ou mesmo em atividades de pesquisa. Vários métodos são usados na identificação de espécies de *Meloidogyne*, incluindo métodos baseados em morfologia, em perfis eletroforéticos e em análise de DNA. A observação do padrão perineal de fêmeas foi a técnica mais usada na diagnose de rotina de espécies do nematoíde-de-galhas por muito tempo. Com a crescente descrição de novas espécies de *Meloidogyne*, percebeu-se similaridade entre padrões perineais de espécies distintas, o que dificultava a acurácia no diagnóstico. A partir da década de 1990, a eletroforese de isoenzimas passou a ser usada como técnica de referência para identificação do nematoíde-de-galhas. Recentemente, técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo validadas para a diagnose de *Meloidogyne*, como, por exemplo, PCR e suas variações, LAMP, microarranjos e sequenciamento. Com a redução dos custos de equipamentos e reagentes, possivelmente essas técnicas serão cada vez mais usadas em procedimentos de rotina.

Palavras-chaves: *Meloidogyne*, biologia molecular, DNA, PCR, esterase, padrão perineal.

Diagnostic methods used in the identification of species of root-knot nematodes

ABSTRACT

Nematodes of the genus *Meloidogyne* are known as root-knot nematodes and cause damage to major agricultural crops of commercial interest around the world. More than 100 species of *Meloidogyne* are known and the same culture can host several species. Accurate identification of the pathogen is essential for its management in the field or even in research activities. Several methods are used in the identification of *Meloidogyne* species, including methods based on morphology, electrophoretic profiles and DNA analysis. The observation of the perineal pattern of females was the technique most commonly used in the routine diagnosis of species of the root-knot nematode for a long time. With the increasing description of new species of *Meloidogyne*, similarity between perineal patterns of distinct species was observed, which made accuracy difficult to diagnose. Since the 1990s, isoenzyme electrophoresis has been used as a reference technique to identify the root-knot nematode. Recently, techniques based on DNA analysis have been validated for the diagnosis of *Meloidogyne*, such as, for example, PCR and its variations, LAMP, microarray and sequencing. By reducing equipment and reagent costs, these techniques are likely to be increasingly used in routine procedures.

Key words: *Meloidogyne*, molecular biology, DNA, PCR, esterase, perineal pattern.

INTRODUÇÃO

O gênero *Meloidogyne* é composto por mais de 100 espécies (HUNT & HANDOO, 2009) e a sua gama de hospedeiros ultrapassa 3000 espécies de plantas (TRUDGILL & BLOK, 2001). Esses nematoides são amplamente distribuídos pelo mundo, sendo encontrados principalmente em regiões temperadas e tropicais (MOENS et al., 2009). As principais espécies encontradas no Brasil são: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne paranaensis*, *Meloidogyne enterolobii* (= *Meloidogyne mayaguensis*), *Meloidogyne ethiopica* e *Meloidogyne coffeicola* (CARNEIRO et al., 1996a, 1996b, 2000, 2004; CASTRO et al., 2003; COFCEWICZ et al., 2004; Ferraz, 2008; MUNIZ et al., 2008; SANTOS et al., 2012).

Os nematoides-de-galhas radiculares são endoparasitos sedentários em que, dos ovos depositados pelas fêmeas, eclodem juvenis de segundo estágio (J₂), que apresentam corpo filiforme. Os J₂ penetram nas raízes das plantas, estabelecem um sítio permanente de alimentação formado por células nutridoras (ou células gigantes) e tornam-se obesos. Proliferação de organelas, núcleos, invaginações da membrana celular, aumento da espessura da parede celular e metabolismo intensificado são alterações comuns nas células-gigantes. A composição de solutos e a pressão da parede celular também são alteradas, bem como a necessidade de ATP e, aparentemente, de substâncias transportadoras de sacarose e aminoácidos, que são utilizadas na nutrição do nematoide (BALDACCI-CRESP et al., 2015). O xilema e o floema ficam obstruídos em decorrência dessas modificações, comprometendo o fluxo normal de fotoassimilados, água e nutrientes da planta (SIDDIQUI et al., 2014).

Por outro lado, os danos que causam nas raízes, principalmente pela formação de galhas e diminuição do número de raízes finas, são visíveis e geralmente muito comprometedores. Galhas são protuberâncias que ocorrem nas raízes infestadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, razão do nome vulgar desses parasitos. As galhas são formadas no local em que fêmeas de *Meloidogyne* estão localizadas. Quando uma galha é aberta cuidadosamente, é possível visualizar uma ou mais dessas minúsculas fêmeas. As consequências das alterações bioquímicas e morfológicas causadas pelo nematoide são o

crescimento anormal das plantas, o amarelecimento das folhas e as raízes reduzidas, com deformações e bifurcações devido à intensa formação de galhas (PINHEIRO et al., 2010). Em determinadas circunstâncias, a perda de peso não é tão significativa quanto as alterações no formato das raízes. As deformações nas raízes afetam diretamente a qualidade de alguns produtos agrícolas, a exemplo da cenoura, batata e beterraba (PINHEIRO & HENZ, 2008; PINHEIRO et al., 2010).

Em razão da importância econômica dos nematoides-de-galhas, a identificação acurada das espécies é crucial para a elaboração de estratégias de manejo. A diagnose baseada em caracteres morfológicos predominou por muito tempo, com destaque para a observação do padrão perineal das fêmeas (SEESSAO et al., 2016). Posteriormente, a técnica de eletroforese de isoenzimas passou a ser adotada em procedimentos de rotina. Na última década, vários protocolos de diagnose por meio de técnicas moleculares baseadas em DNA foram desenvolvidos. Devido à crescente redução dos custos associados a esses métodos, é possível que a abordagem molecular seja usada na rotina de identificação de espécies do nematoide das galhas, principalmente de forma integrada com outros métodos (OLIVEIRA et al., 2011). Nesta revisão, os principais métodos usados na diagnose de espécies de *Meloidogyne*, suas vantagens e limitações e a contextualização do uso das técnicas para identificação dos agentes causais de meloidoginoses no Brasil serão abordados.

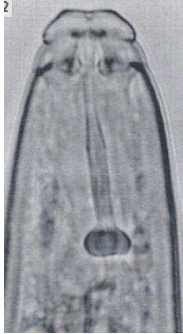
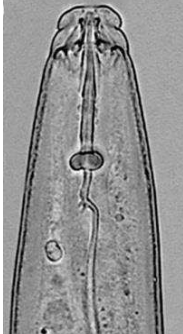
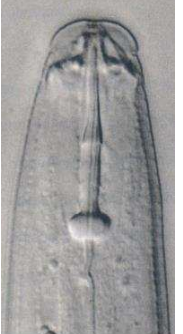
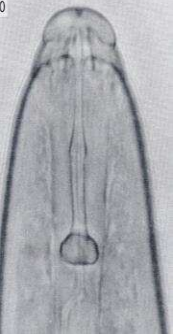
Métodos Diagnósticos

1.1. Método baseado em morfologia: observação dos caracteres morfológicos dos machos

Os caracteres morfológicos da região anterior dos machos podem auxiliar no diagnóstico de algumas espécies de *Meloidogyne*, principalmente na diferenciação de *M. enterolobii*, *M. paranaensis* e *M. incognita*. Algumas espécies (por exemplo, *M. paranaensis*) podem ser identificadas com segurança, desde que se obtenham montagens de lâminas de machos com espécimes em posição lateral.

A região cefálica dos machos inclui um disco labial cercado por lábios laterais e medianos. O tamanho, a altura e a forma da região cefálica, a presença de anelações (estrias) na cápsula cefálica são características úteis para distinguir espécies e populações de *Meloidogyne* (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991). A distância entre a abertura da glândula dorsal esofagiana e a base dos nódulos basais do estilete (DGO) de machos também pode ser uma característica importante na identificação. Por exemplo, ALMEIDA et al. (2008) demonstraram ser essa uma variável importante para a distinção entre de *M. enterolobii* e *M. incognita*. Além disso, o tamanho do estilete e forma do cone, da haste e dos bulbos são importantes componentes na identificação das espécies. Porém, muitas vezes, há sobreposição dos valores do tamanho do estilete, dificultando a separação de espécies com base somente nessa característica. As características úteis da região anterior dos machos das principais espécies de *Meloidogyne* que ocorrem no Brasil estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Características da região anterior dos machos de *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, *M. paranaensis* e *M. javanica*.

Características	Espécies			
	<i>M. incognita</i>	<i>M. enterolobii</i>	<i>M. paranaensis</i>	<i>M. Javanica</i>
Fotografia da região anterior				
Região labial	Com estrias transversais	Lisa	Lisa, com algumas estrias incompletas	Lisa
Cápsula cefálica	Alta, larga e com disco labial côncavo	Disco labial não proeminente e lábios submedianos fundidos, pouco rebaixados.	Placa labial mais larga que a base da região labial, com disco labial ovalado	Alta, larga e com disco labial arredondado
DGO*	Curta (2 - 3 µm)	Longa (4,1 - 4,7 µm)	Longa (3,5 - 5,0 µm)	Curta (2 - 3 µm)

DGO * = Distância entre a abertura da glândula esofágica dorsal e a base dos nódulos basais do estilete.

1.2. Método baseado em morfologia: observação do padrão perineal de fêmeas

A principal técnica de identificação de espécies do nematoide-de-galhas baseada em morfologia é a observação do padrão perineal de fêmeas (FREITAS et al., 2016). O critério para distinção das espécies é a análise visual do padrão de marcas cuticulares (estrias, campos laterais, arco dorsal e fasmídios) na região do períneo das fêmeas, onde estão localizados a vulva e o ânus, conforme figura 1 (HUNT & HANDOO, 2009).

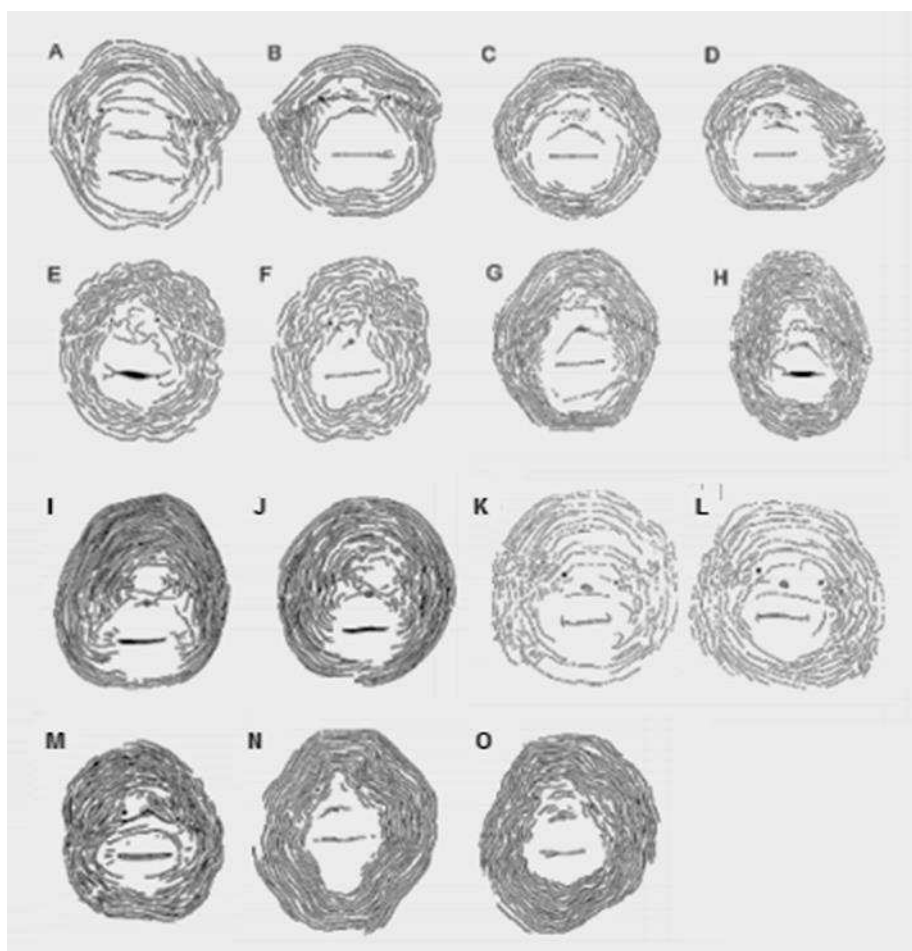


Figura 1 – Padrões perineais de doze espécies de *Meloidogyne*. (A, B): *M. arenaria*; (C, D): *M. hapla*; (E, F): *M. incognita*; (G, H): *M. javanica*; (I, J): *M. Enterolobii*; (K, L): *M. exigua*; (M): *M. ethiopica* and (N, O): *M. paranaensis*.

Fonte: adaptado de HUNT & HANDOO, 2009.

Para isso, as fêmeas são cortadas e a região da cutícula contendo o períneo é colocada em lâmina de microscopia para análise. É uma técnica barata, pois demanda apenas microscópio, lâminas de microscopia, ácido láctico e glicerina. Detalhes sobre o preparo dos cortes perineais podem ser encontrados em TAYLOR & NETSCHER (1974) e FREITAS et al. (2016). Em 1949, o uso desta técnica foi proposto para identificação das quatro principais espécies de *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* (CHITWOOD, 1949). No entanto, com a descoberta de novas espécies do patógeno percebeu-se que essa técnica não era acurada o suficiente para permitir a distinção entre as várias espécies (INOMOTO et al., 2016). A identificação errônea das espécies *M. enterolobii* e *M. inornata* como sendo *M. incognita*, devido à semelhança do padrão perineal, é um exemplo notório dessa situação (CARNEIRO et al., 2016). Além disso, a identificação morfológica demanda conhecimentos taxonômicos especializados (CORDEIRO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011) e apenas as fêmeas do nematoide podem ser usadas no processo, o que significa que raízes com as fêmeas devem estar disponíveis para a diagnose (SEESSAO et al., 2016).

1.3. Método bioquímico: eletroforese de isoenzimas

A eletroforese de isoenzimas é a principal técnica bioquímica usada na diagnose de espécies de *Meloidogyne* (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1990; CARNEIRO et al., 2000; CARNEIRO & ALMEIDA, 2001). Baseia-se na mobilidade relativa das enzimas extraídas de fêmeas adultas em oviposição. É eficiente na distinção de espécies do nematoide e demanda relativamente pouco tempo (duas a três horas, entre processamento das amostras e etapas de preparo, corrida e revelação do gel). Tem sido o método diagnóstico de espécies do nematoide-de-galhas mais usado em rotina (BLOK & POWERS, 2009; HUNT & HANDOO, 2009).

Para o estudo do polimorfismo de isoenzimas, uma a dez fêmeas adultas são excisadas das raízes com auxílio de estilete de ponta fina e estereomicroscópio. As fêmeas são transferidas para microtubos contendo tampão de extração (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001), maceradas com pistilo e aplicadas em cavidade formadas no gel de poliacrilamida. O extrato proteico de

amostras de culturas puras de *M. javanica* (Treub) Chitwood é aplicado em duas cavidades de cada gel e é usado como referência de comparação entre os fenótipos das demais amostras (Figura 2) (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001).

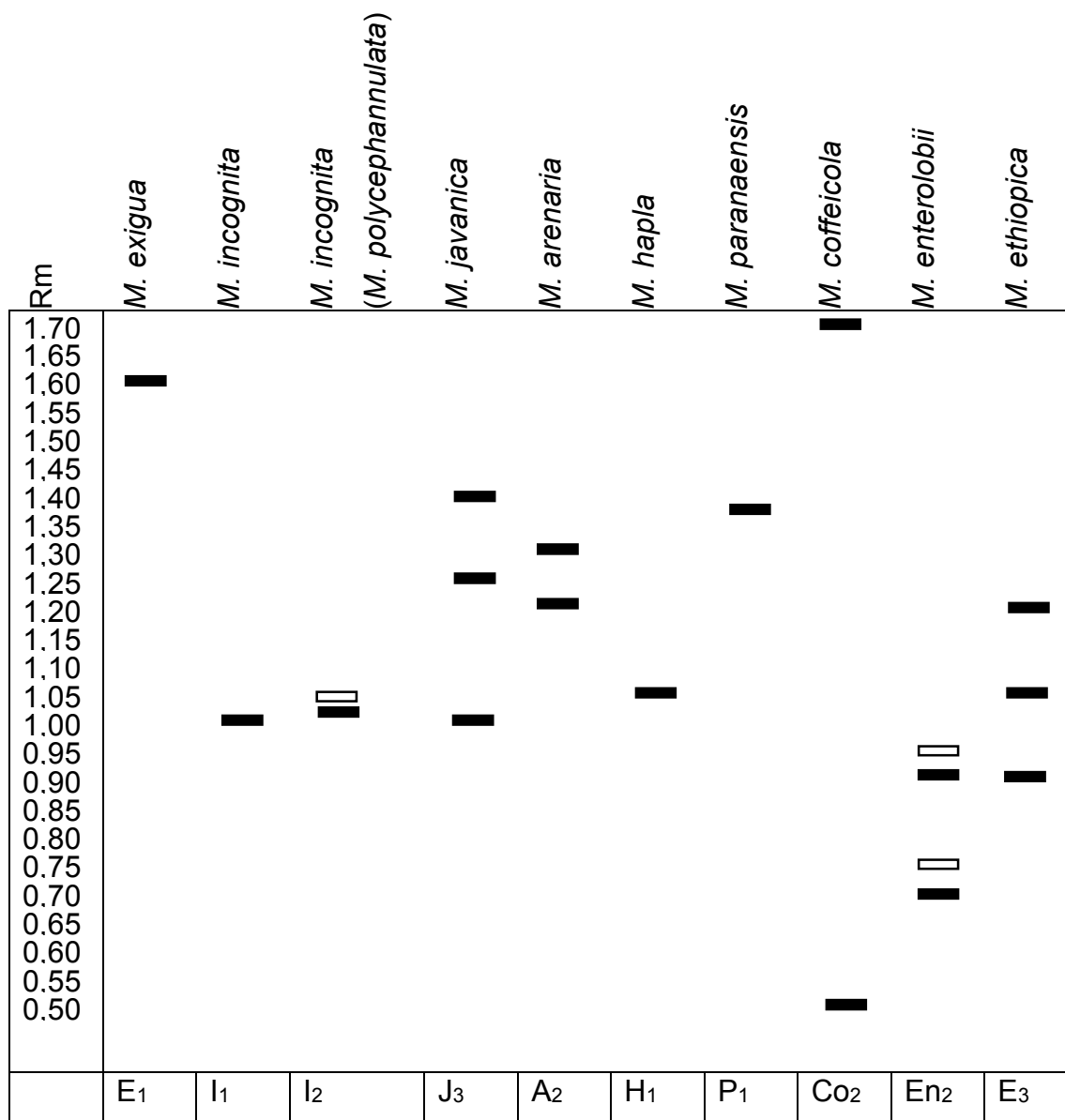


Figura 2 – Perfil fenotípico da enzima esterase das principais espécies de *Meloidogyne* descritas no Brasil. Caixas incolores representam bandas fracas, caixas preenchidas representam bandas fortes. Rm: Razão de migração em relação à banda mais lenta (Rm = 1,0) de *M. javanica*. E₁, I₁, I₂, J₃, A₂, H₁, P₁, Co₂, En₂ e E₃: códigos utilizados para identificação do padrão de bandas de esterase de *M. exigua*, *M. incognita*, *M. incognita* = *M. polycephannulata*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. paranaensis*, *M. coffeicola*, *M. enterolobii* e *M. ethiopica*, respectivamente.

Fonte: Adaptado de CARNEIRO et al. (2016).

A revelação do gel para exibição de fenótipos de esterase (EST) é a principal forma usada para distinção das espécies de *Meloidogyne* (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1990; CARNEIRO et al., 1996b; CARNEIRO & ALMEIDA, 2001), embora outras enzimas também podem ser usadas de forma complementar, como, por exemplo, malato desidrogenase (MDH), superóxido desmutase (SOD) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) (FREITAS et al., 2016). Em alguns casos, o fenótipo de EST é semelhante entre duas espécies, a exemplo de *M. naasi* e *M. exigua*. Nessa situação, o perfil de MDH pode ser usado para diferenciar as espécies (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1990).

Segundo CARNEIRO et al. (2016), o primeiro estudo com uso de esterases de fêmeas individualizadas foi realizado por JANATI et al. (1982), que conseguiram identificar 75 dentre as 86 populações analisadas. Ainda nos anos 1980, ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU (1985) usaram a técnica para estudar 300 populações de *Meloidogyne* vindas de 65 países. Essa técnica também foi empregada para identificação de espécies de *Meloidogyne* na África (FARGETTE, 1987) e em Portugal (PAIS & ABRANTES, 1989). Carneiro e sua equipe realizaram várias pesquisas no Brasil usando eletroforese de isoenzimas (CARNEIRO et al., 1996a, b, 2000). Em 1996, essa técnica foi responsável pela correta identificação da espécie *M. paranaensis*, erroneamente identificada como *M. incognita* por 14 anos (CARNEIRO et al., 1996b). Em 2007, a técnica foi empregada para estudos de *Meloidogyne* em arroz (STEFFEN et al., 2007) e cana-de-açúcar no sul do Brasil (BELLÉ et al., 2016). A partir dos anos 1990, a técnica passou a ser mais difundida e usada em várias partes do mundo (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1990).

A disponibilização de diagramas esquemáticos ou fotos dos perfis eletroforéticos de referência das espécies contribuiu para a popularização da técnica, somado à redução dos custos dos equipamentos e reagentes (Figura 2) (CARNEIRO et al., 2016). O custo de sistemas de eletroforese tem reduzido muito nos últimos anos e tornado essa técnica comum mesmo em laboratório com poucos recursos. No entanto, variações intraespecíficas podem ocorrer em algumas espécies e dificultar a acurácia da diagnose, como, por exemplo, em *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. exigua* e *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 2016). Além disso, fêmeas maduras são requeridas para identificação e, no caso de

espécies com fêmeas pequenas, tal qual *M. exigua*, vários indivíduos são necessários (CARNEIRO et al., 2000). A exigência do uso apenas de fêmeas maduras também é uma desvantagem, uma vez que os ovos e juvenis de segundo estágio são as formas de *Meloidogyne* mais comumente encontradas no solo.

De fato, eletroforese de isoenzimas é uma técnica de grande valia para caracterizar as espécies de *Meloidogyne* que já foram previamente estudadas bioquimicamente e possuem padrões isoenzimáticos; assim estudos podem ser realizados viabilizando e facilitando os levantamentos no campo, determinando a frequência e a distribuição relativa das espécies; detectando populações misturadas para proceder à purificação dessas populações antes de conduzir estudos em resistência de plantas ou especificidade de hospedeiros; e caracterizar fenótipos atípicos, ou seja, espécies ainda não descritas (CARNEIRO et al., 2000).

Entretanto, esta técnica apresenta algumas limitações como não permitir a separação de raças fisiológicas, utilizar apenas fêmeas maduras (conforme relatado anteriormente) e não existir perfis caracterizados para todas as espécies de *Meloidogyne* descritas. No entanto, CARNEIRO et al. (2016) apresentaram os perfis para 20 populações brasileiras de *Meloidogyne* spp, enquanto que BLOK & POWERS (2009), revisando o assunto, sumarizaram as informações dos perfis típicos e atípicos de esterase e malato desidrogenase para 44 espécies de nematoide-de-galhas.

1.4. Métodos moleculares

As técnicas moleculares baseiam-se na dissimilaridade genética entre táxons, expressa por variações em regiões do DNA genômico. Os genes 18S, 28S, 5.8S (Figura 3), que codificam o RNA ribossômico, as regiões do espaçador interno transcrito (ITS), espaçador externo transcrito (ETS) e espaçador intergênico (IGS) são regiões do DNA amplamente utilizadas na identificação e estudos filogenéticos de fitonematoides, incluindo *Meloidogyne* (BLOK & POWERS, 2009). A base multicópia do DNA que codifica rRNA contém variação e estabilidade para discriminação da maioria das espécies sendo encontrada

variação intraespecífica (ZIJLSTRA et al., 1995; HUGALL et al., 1999; ADAM et al., 2007; BLOK & POWERS, 2009).

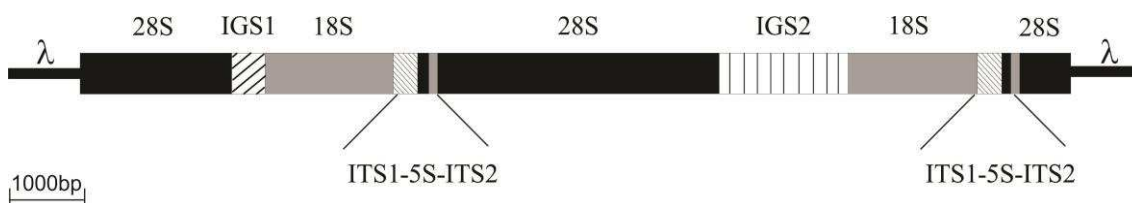


Figura 3 - Diagrama da organização da região de DNA ribossomal de *Meloidogyne artiella*.

Fonte: Adaptado de VERONICO et al., 2004.

A subunidade menor do ribossomo (18S rDNA ou SSU rDNA – *Small Subunit RNA*) tem sido usada em estudos envolvendo relações entre-gêneros, por ter baixa taxa de evolução (ROBERTS et al., 2016). Em análise filogenética com 12 espécies de *Meloidogyne* usando o marcador 18S, por exemplo, foi possível agrupá-las em três clados distintos: Clado I: *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*; Clado II: *M. hapla* raças A e B, *M. duytsi* e *M. maritima* e Clado III: *M. exigua*, *M. graminicola* e *M. chitwoodi* (DE LEY et al., 2002). A subunidade maior do ribossomo (28S rDNA ou LSU rDNA – *Large Subunit RNA*) possui regiões conservadas e outras com maior taxa de variação, como a região de expansão D2/D3. Por isso, essa região tem sido selecionada como alvo para desenvolvimento de diagnósticos em níveis taxonômicos mais estreitos, como espécies (ROBERTS et al., 2016). Análise filogenética envolvendo nove espécies de *Meloidogyne* usando como alvo a região 28S (TENENTE et al., 2004) também agrupou as espécies de forma similar ao uso da região 18S (DE LEY et al., 2002).

As regiões espaçadoras (ITS, ETS e IGS) são frequentemente usadas para o desenvolvimento de diagnósticos de fitonematoides, com destaque para as regiões ITS. A existência de múltiplos tipos de ITS é uma desvantagem do uso dessa região no desenvolvimento de protocolos de diagnóstico (ROBERTS et al., 2016). PCR-RFLP e PCR-RAPD usando as regiões ITS foram utilizados para identificar *M. arenaria*, *M. camelliae*, *M. mali*, *M. marylandi*, *M. suginamiensis* (ORUI, 1999), *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. chitwoodi*, *M. fallax* (ZIJLSTRA et al., 1995) e *M. naasi* (SCHMITZ et al., 1998).

O uso integrado de diagnósticos cujos alvos são as regiões ITS, 18S e D2/D3 (28S) pode ajudar a identificar corretamente espécies de difícil diferenciação (BLOK & POWERS, 2009). *Meloidogyne hispanica* e *M. ethiopica* podem ser diferenciadas se o alvo for a região D2/D3, mas o mesmo não ocorre se o alvo for a região ITS (LANDA et al., 2008; BLOK & POWERS, 2009). A região IGS pode ser usada para distinguir *M. chitwoodi* e *M. fallax* de outras espécies, incluindo *M. enterolobii*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* (BLOK et al., 1997a; PETERSEN et al., 1997; BLOK et al., 2002; WISHART et al., 2002).

Além do rDNA, o DNA mitocondrial (mtDNA) também pode ser usado na identificação e análises filogenéticas de nematoides, especialmente o gene citocromo oxidase subunidades I (COI, CO1 ou COX 1) e II (COII, COII ou COX 2) (Figura 4) (BLOK & POWERS, 2009). Múltiplas cópias do mtDNA são encontradas por célula, o que facilita sua amplificação. Além disso, é altamente conservado entre animais e possui regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas, permitindo o desenho de primers capazes de amplificar fragmentos distintos entre espécies (ROBERTS et al., 2016). A unidade COI pode ser usada em estudos filogenéticos e na diagnose de fitonematoides (ZHAO et al., 2008; KUMARI et al., 2010; TOUMI et al., 2013), incluindo nematoide-de-galhas (KIEWNICK et al., 2014; JANSEN et al., 2016; JOSEPH et al., 2016).

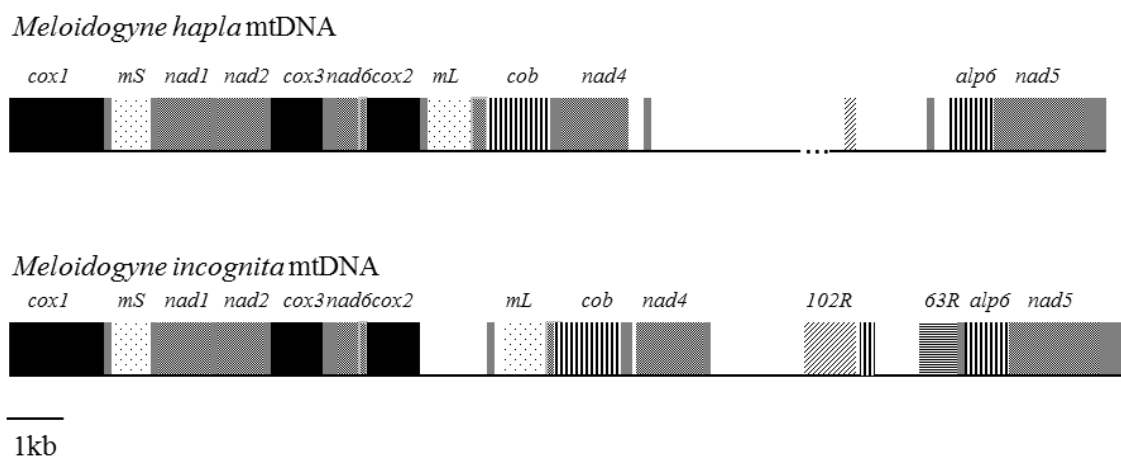


Figura 4 - Mapas lineares dos genomas mitocondriais de *Meloidogyne hapla* e *M. incognita*.

Fonte: Adaptado de GARCÍA & SÁNCHEZ-PUERTA, 2015.

Ao contrário da eletroforese de isoenzimas e da observação dos padrões perineais nos quais fêmeas são usadas nos procedimentos diagnósticos, nos métodos moleculares outros estádios podem ser usados, a exemplo de juvenis, machos e ovos (OLIVEIRA et al., 2011). Outra vantagem associada aos métodos moleculares é que profissionais altamente especializados em taxonomia não são necessários, bastando apenas noções elementares da morfologia do patógeno. Além disso, como os conhecimentos sobre os protocolos moleculares de identificação de nematoides são similares aos aplicados a outros organismos, a caracterização molecular pode ser realizada por profissionais que não são especialistas em nematologia (BERRY et al., 2008). Devido à redução dos custos dos equipamentos e reagentes usados em biologia molecular, o uso desses métodos em diagnose de nematoides está cada vez mais acessível (BERRY et al., 2008).

1.4.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nos anos de 1990, a técnica de PCR passou a ser usada em diversas áreas da ciência. Com uso de primers específicos para amplificação de determinadas regiões do genoma, a PCR tem sido usada para diagnóstico de diversos gêneros de fitonematoides (OLIVEIRA et al., 2011). Vários primers estão disponíveis para diagnose do nematoide-de-galhas (Tabela 2). A especificidade dos primers para determinado alvo é uma vantagem, mas requer desenho criterioso das sequências, a ponto de considerar as variações intraespecíficas (ROBERTS et al., 2016).

Tabela 2 – Primers universais e espécie-específicos utilizados na identificação de algumas espécies de nematoide-de-galhas através da reação em cadeia da polimerase.

Código	Sequência (5'→ 3')	Tamanho do Amplicon (pb)	Especificidade e Gene	Referência
194	TTAACTTGCCAGATCGGACG	720	Universal	Blok et al.
195	TCTAATGAGCCGTACGC		(5S – 18S rDNA)	(1997)
D2	ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT	500	Universal	Nunn
D3	TGCGAAGGAACCAGCTACTA		(D2/D3 28S rDNA)	(1992)
C2F3	GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG	-	Universal	Powers &
1108	TACCTTTGACCAATCACGCT		(COII 16S mtRNA)	Harris (1993)
Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	420	<i>M. arenaria</i>	Zijlstra et al. (2000)
Rar	TCGGCGATAGACACTACAAACT		(SCAR)	
-	TCGAGGGCATCTAATAAAGG	950	<i>M. arenaria</i>	Dong et al. (2001b)
-	GGGCTGAATAATCAAAGGAA		(SCAR)	
-	GAAATTGCTTTATTGTTACTAAG	322	<i>M. enterolobii</i>	Blok et al. (2002)
-	TAGCCACAGCAAAATAGTTTTC		(SCAR)	
MK7-F	GATCAGAGGCGGGCGCATTGCGA	520	<i>M. enterolobii</i>	Tigano et al. (2010)
MK7-R	CGAACTCGCTCGAACTCGAC		(SCAR)	
Me-F	AACTTTGTGAAAAGTGCCGCTG	236	<i>M. enterolobii</i>	Long et al. (2006)
Me-R	TCAGTTCAGGCAGGATCAACC		(SCAR)	
meth-F	ATGCAGCCGCAGGGAACGTAGTTG	350	<i>M. ethiopica</i>	Correa et al. (2014)
meth-R	TGTTGTTTCATGTGCTTCGGCATC		(SCAR)	
exD15-F	CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG	562	<i>M. exigua</i>	Randig et al. (2002)
exD15-R	CTCCGTGGGAAGAAAGACTG		(SCAR)	
-	CAGGCCCTTCCAGCTAAAGA	960	<i>M. hapla</i>	Williamson et al. (1997)
-	CTTCGTTGGGGAACGAAGA		(SCAR)	
-	TGACGGCGGTGAGTGCGA	610	<i>M. hapla</i>	Zijlstra, (2000)
-	TGACGGCGGTACCTCATAG		(SCAR)	
-	GGCTGAGCATAGTAGATGATGTT	1500	<i>M. hapla</i>	Dong et al. (2001a)
-	ACCCATTAAGAGGAGTTTTGC		(SCAR)	
Finc	CTCTGCCAATGAGCTGTCC	1200	<i>M. incognita</i>	Zijlstra et al. (2000)
Rinc	CTCTGCCCTCACATTAAG		(SCAR)	
-	TAGGCAGTAGGTTGTCCGGG	1350	<i>M. incognita</i>	Dong et al. (2001a)
-	CAGATATCTCTGCATTGGTGC		(SCAR)	
Inc-K14-F	GGGATGTGTAATGCTCCTG	399	<i>M. incognita</i>	Randig et al. (2002)
Inc-K14-R	CCCGCTACACCCTCAACTTC		(SCAR)	
MI-F	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG	955	<i>M. incognita</i>	Meng et al. (2004)
MI-R	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC		(SCAR)	
Mi2F4	ATGAAGCTAAGACTTTGGGCT	300	<i>M. incognita</i>	Kiewnick et al. (2013)
Mi1R1	TCCCGCTACACCCTCAACTTC		(SCAR)	
Fjav	GGTGC GCGATTGAACTGAGC	670	<i>M. javanica</i>	Zijlstra et al. (2000)
Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC		(SCAR)	
-	CCTTAATGTCAACACTAGAGCC	1650	<i>M. javanica</i>	Dong et al., (2001b)
-	GGCCTTAACCGACAATTAGA		(SCAR)	
-	ACGCTAGAATTTCGACCCTGG	517	<i>M. javanica</i>	Meng et al., (2004)
-	GGTACCAGAAGCAGCCATGC		(SCAR)	
Par-F	GCCCGACTCCATTTGACGGA	208	<i>M. paranaensis</i>	Randig et al. (2004)
Par-R	CCGTCCAGATCCATCGAAGTC		(SCAR)	
JMV1	GGATGGCGTGCTTTCAAC	440,	<i>M. hapla</i> , <i>M.</i>	Wishart et al. (2002)
JMV2	TTTCCCCTTATGATGTTTACCC	540,	<i>chitwoodi</i> e <i>M.</i>	
JMV	AAAAATCCCCTCGAAAAATCCACC	670	<i>fallax</i>	
			(IGS – SCAR)	

Os principais métodos moleculares de diagnose de nematoides, que usam a PCR como técnica básica, serão discutidos a seguir, como RAPD, SCAR, AFLP, RFLP, microssatélites, qPCR e PCR multiplex (SEESSAO et al., 2016). A diagnose molecular de nematoides também pode ser feita por meio da amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP), sequenciamento e microarranjos de DNA.

1.4.1.1. Multiplex PCR (PCR multiplex)

Nessa variação da PCR, dois ou mais conjuntos de primers são usados para garantir a amplificação simultânea de vários alvos. Os primers correspondentes a cada um dos alvos são preparados em conjunto com os demais reagentes. Com isso, os produtos de amplificação dos diferentes alvos são visualizados em um único gel, economizando principalmente tempo, mão-de-obra e reagentes. O inconveniente dessa reação é que os fatores de amplificação tempo/temperatura tem que ser coincidentes em todas as fases da reação. A capacidade de detecção de uma espécie em baixa densidade populacional na amostra pode também ser inibida quando uma alta concentração de DNA de outra espécie alvo se faz presente (ZIJLSTRA & VAN HOOFF, 2006). Por exemplo, em uma reação multiplex, *Xiphinema elongatum* amplifica melhor que *M. javanica* e, esse último, amplifica melhor que *Pratylenchus zae* (BERRY et al., 2008).

Alguns protocolos para PCR multiplex foram desenvolvidos para identificação de *Meloidogyne*. Na China, *M. incognita*, *M. enterolobii* e *M. javanica* foram identificados e detectados a partir de três pares de primers específicos e um universal (HU et al., 2011). Nesse caso, todas as espécies produziram bandas próximo de 500 pb com uso de primer universal (D2/D3), enquanto que primers específicos para *M. incognita*, *M. enterolobii* e *M. javanica* produziam bandas de aproximadamente 1000, 200 e 700 pb, respectivamente (HU et al., 2011). A espécie *M. graminicola* pode ser identificada com única reação de PCR com o uso conjunto de primers universais D2/D3 e os específicos Mg-F3/Mg-R2 (HTAY et al., 2016). A identificação das espécies tropicais *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* também é possível por meio de PCR multiplex (KIEWNICK et al., 2013).

1.4.1.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Na análise de RAPD, um único primer curto (8-12 nucleotídeos) é usado em reação de PCR para amplificar vários locos anônimos do genoma do organismo alvo (WILLIAMS et al., 1990). Não requer nenhum conhecimento específico sobre o genoma do nematoide. O custo da técnica é menor do que a PCR com primers específicos, requer menor número de etapas e é de fácil implementação. ORUI (1999), por exemplo, demonstrou que é possível distinguir 10 espécies de *Meloidogyne* usando RAPD. No entanto, a repetibilidade é baixa e há pouca consistência entre diferentes laboratórios (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), exigindo cumprimento rigoroso dos procedimentos (BLOK & POWERS, 2009). Essa técnica foi e ainda é muito útil para o desenvolvimento de primers SCAR (ZIJLSTRA et al., 2000; RANDING et al., 2002; MENG et al., 2004; CORREA et al., 2014; BELLAFFIORE et al., 2015; ALI et al., 2016).

1.4.1.3. Sequence-characterized amplified region (SCAR)

Marcadores SCAR são desenvolvidos a partir da caracterização e sequenciamento de bandas polimórficas resultantes de análise de RAPD (PARAN & MICHELMORE, 1993). Primers são desenhados para amplificar parte do fragmento polimórfico via PCR, podendo resultar em especificidade de diagnóstico. Os primers SCAR possuem sequência mais longa do que aqueles usados em RAPD e, talvez por isso, resultem em maior reprodutibilidade. Marcadores SCAR foram desenvolvidos para a identificação de *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. paranaensis*, *M. exigua*, *M. enterolobii* e *M. ethiopica*, conforme dados apresentados na tabela 2 (WILLIAMSON et al., 1997; ZIJSTRA et al., 2000; DONG et al., 2001a; DONG et al., 2001b; BLOK et al., 2002; WISHART et al., 2002; MENG et al., 2004; RANDIG et al., 2004; LONG et al., 2006; TIGANO et al., 2010; CORREA et al., 2014). Recentemente, marcadores SCAR foram usados na análise de 24 populações de *M. graminicola* do Vietnã, Brasil e Filipinas (BELLAFFIORE et al., 2015) e também no estudo da distribuição de espécies de *Meloidogyne* em oliveira no Marrocos (ALI et al., 2016).

1.4.1.4. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Nesse método, o DNA é amplificado por meio de PCR usando primers universais e, em seguida, é submetido a clivagem por enzimas de restrição. Como as sequências de nucleotídeos variam entre as espécies, os sítios de restrição diferem quanto às suas localizações ao longo do genoma, resultando em fragmentos de tamanhos diferentes que são separados por migração eletroforética (SEESSAO et al., 2016). Muitos autores adotam essa técnica para fins de estudos mais detalhados que a PCR unicamente (SEESSAO et al., 2016). A capacidade de distinção de organismos que apresentam o mesmo comprimento de produto de PCR, mas que são polimórficos quanto à sequência dentro da região amplificada é uma vantagem dessa técnica. Com o uso de primers que amplificam a região entre COII e LrRNA do DNA mitocondrial, uma banda de 500 pb é formada a partir de amostras de DNA de *M. hapla*, enquanto uma banda de 1,7 kb é formada para amostras de *M. incognita* e *M. arenaria* (HAN et al., 2004). Para distinção entre as duas últimas espécies, os produtos da PCR são clivados com as enzimas de restrição Hinf I e Alu I, resultando em fragmentos de tamanhos distintos entre *M. incognita* e *M. arenaria*, permitindo assim sua diagnose (HAN et al., 2004). No entanto, a possível ocorrência de falsos-positivos a partir de organismos não alvos é uma desvantagem associada com a PCR-RFLP (ROBERTS et al., 2016).

1.4.1.5. Microssatélites

O genoma de seres eucariotos possuem sequências repetidas com alto grau de polimorfismo e que podem ser usadas como marcadores genéticos (FERGUSON et al., 1995; MILACH, 1998; MATIOLI, 2001; SALLES et al., 2003). Esses marcadores são caracterizados por sequências de um a seis nucleotídeos que podem estar repetidos em tandem (SALLES et al., 2003). São conhecidos como sequências simples repetidas (SSR) ou microssatélite. São altamente polimórficos e informativos; codominantes; ocorrem abundantemente no genoma de eucariotos; necessitam de pequena quantidade de DNA; estão presentes em regiões codificadoras e não-codificadoras; estão bem dispersos no genoma e os locos são frequentemente conservados entre espécies relacionadas (LIMA, 1998; MOREIRA, 1999; ZANE et al., 2002; SALLES et al., 2003).

Ainda que pouco estudados, esses marcadores podem ser úteis na diagnose de espécies de *Meloidogyne*. O microssatélite GAAA, por exemplo, permite a identificação de *Meloidogyne artiella* (DE LUCA et al., 2002).

1.4.1.6. PCR em tempo real (Real-Time PCR)

A PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) permite a detecção e quantificação de DNA com base na emissão de fluorescência. O termociclador possui sistema óptico de captura de fluorescência e os dados são processados por um computador, sendo calculado o “cycle threshold” (CT), ou seja, o número de ciclos necessários para início da amplificação da sequência-alvo. Os dois principais sistemas usados na produção de fluorescência em qPCR são sondas de hidrólises (denominada anteriormente de Taqman®) e o corante SYBR Green®. No primeiro, sondas fluorescentes hibridizam na região complementar-alvo. A sonda emite fluorescência na sua extremidade 5', devido a presença de fluoróforo conhecido como “repórter”. Na extremidade 3' da sonda existe um composto (“quencher”) que absorve a fluorescência do repórter, impedindo que seja detectada pelo sistema óptico do termociclador. No entanto, quando a sonda hibridiza na região-alvo e ocorre a amplificação, a enzima Taq DNA polimerase degrada a sonda e a fluorescência emitida pelo repórter é captada pelo sistema óptico do equipamento. A emissão de luz é aumentada de forma exponencial a medida em que ocorre a amplificação. Na tela do computador integrado ao termociclador, é possível detectar e quantificar em tempo real a amplificação (KUBISTA et al., 2006).

No segundo sistema, o composto SYBR Green® se liga a fitas duplas de DNA, emitindo fluorescência. Durante a extensão de novas fitas duplas por ação da DNA polimerase, a fluorescência é emitida. A amplificação também é proporcional à fluorescência e é detectada e quantificada em tempo real (PONCHEL et al., 2003). Esse sistema é mais barato do que as sondas de hidrólise, mas possui o inconveniente da possibilidade de superestimar a concentração do fragmento alvo, uma vez que pode se ligar a todo DNA fita dupla na reação, incluindo os formados por primers.

Geralmente, plataformas de qPCR são baseadas normalmente em placas de 96 poços que permitem a análise de 80 ou mais amostras simultaneamente

(deixando espaço para os padrões internos). Os protocolos de qPCR podem ser utilizados para identificação e quantificação de nematoides na amostra, além de proporcionarem novas possibilidades para analisar um grande número de amostras, principalmente no serviço de certificação fitossanitária, através da automatização da extração e procedimentos moleculares que aumentam a velocidade e precisão dos resultados. Diagnósticos com base em qPCR estão disponíveis para detecção de *M. incognita* (TOYOTA et al., 2008; MIN et al., 2012), *M. javanica* (BERRY et al., 2008), *M. arenaria* (AGUDELO et al., 2011) e *M. hapla* (SAPTOKA et al., 2016) (Tabela 3).

Em relação à PCR convencional, essa técnica é mais rápida, sensível, quantitativa e dispensa o preparo e a revelação de géis. Atualmente, os altos custos dos equipamentos e dos reagentes ainda são desvantagens dessa técnica em relação à PCR convencional. No entanto, como o custo de equipamentos e reagentes decresce continuamente, a tendência é que essa principal desvantagem (alto custo) da qPCR deixe de ser um empecilho.

Tabela 3- Primers e sondas para identificação de algumas espécies de *Meloidogyne* por PCR em tempo real.

Espécie	Código	Sequência (5'→3')	Referência
<i>M. arenaria</i> *	QareF	TCCATTTCTCCTTGGGTTTG	Agudelo et al. (2011)
	QareR	GCCATCCCTTCACACGTTAT	
<i>M. incognita</i> *	RKNf	GCTGGTGTCTAAGTGTGCTGATAC	Toyota et al. (2008)
	RKNr	GAGCCTAGTGATCCACCGATAAG	
<i>M. Hapla</i>	Foward	TGGTTCAGGGTCATTTTTCTATAAAGT	Saptoka et al. (2016)
	Reverse	CAAATCGCTGCGTACCAACA	
	Sonda	FAM-CCATTGGCACTATAAC-MGB	
<i>M. enterolobii</i>	Ment17F	TGTGGTGGCTCATTTTCATTA	Kiewnick et al. (2015)
	Ment17R	AAAAACCCTAAAAATACCCCAA	
	Sonda (LNA probe 17)	AGGAGCTG	
<i>M. minor</i>	Mminor_f299	CCGTGACTGAATATGAGGTGA	De Weerd et al. (2011)
	Mminor_r362	GAGGCTCATTAAAGTCTTACGATTAT	
	P_Mm_MGB 321	FAM-ATGTTAGGATTATCG-MGBNFQ	
<i>Meloidogyne</i> spp.*	Melo-R long	GGCCTCACTTAAGAGGCTCA	Berry et al. (2008)
	Melo-R short	TATACAGCCACGGACGTTCA	

*Sistema SYBR Green

1.4.1.7. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

A técnica de amplificação de DNA mediada por loop (LAMP) foi desenvolvida no ano 2000 (NOTOMI et al., 2000). Ela permite amplificar ácidos nucléicos com alta especificidade, sensibilidade (até 10 vezes mais sensível do que a PCR), eficiência e rapidez em condições isotérmicas. Esse procedimento requer o uso de quatro a seis primers (FIP, BIP, F3, B3, podendo ter até dois primers adicionais para aumentar a eficiência de amplificação – LB e LF) e uma enzima de polimerase de DNA com atividade de deslocamento de fita (Bst polimerase). Todo o procedimento é finalizado em pouco mais de 1 h e as condições isotérmicas (60 – 65°C) podem ser alcançadas com uso de equipamentos simples, como banho-maria ou bloco de aquecimento (NOTOMI et al., 2000). A visualização dos produtos finais da reação pode ser feita a olho nu.

LAMP tem sido usada com sucesso na medicina, veterinária, microbiologia de alimentos e em fitopatologia, especialmente envolvendo a diagnose de fungos e vírus. Essa técnica ainda foi pouco explorada na diagnose do nematoide-de-galhas, com exceção de um diagnóstico com primers universais para o gênero *Meloidogyne*, além de protocolos específicos para *M. incognita*, *M. enterolobii* e *M. hapla* (Tabela 4).

Tabela 4- Primers para identificação de espécies de *Meloidogyne* por LAMP

Especificidade	Primers (5'→3')	Referência
<i>Meloidogyne</i> spp. (Universal)	RKN-F3 CTGCCCTTTGTACACACC RKN-B3 GACACCAGCGACAGCCGTT RKN-FIP CTGCGATTAAATTGGTTTCCATCAACGGGACTGAGCCATTTCG RKN-BIP GCTTGAACCGGGCAAAGTCCATAAAGTAATGATCCAGCAGC RKN-LB GTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAAC	Niu et al. (2011)
<i>M. incognita</i>	Mi-F3 TATGTCAGCCCCGGTTC Mi-B3 GAGAAGGAAAAGAGTGCCAA Mi-FIP CTTTCCTTGAATTGGAACAGGGTCAATTGCTTTATATCAAACACC Mi-BIP GGACGGAGAAGTATGTTCTCTCTGGAAAAGAAAAATCAGTCTT	Niu et al. (2011)
<i>M. enterolobii</i>	Me-F3 CCAAGTACTAAGGAAGCCC Me-B3 ATCCTAATTTYCTCCACACA Me-FIP ACAGTGATTACGACCATACCGGTTGTTGCTTAACTTGCCAGA Me-BIP TCTAAGGCAAAGTGGGCGGAGCTCTYTTTGCCTTAAACCATTCCC Me-LF AAGCACGCCATCCCGTC Me-LB TGTTGTTGCTGTTGCG	Niu et al. (2012)
<i>M. hapla</i>	Mh-F3 GAATATGAGGTGACATGTTAGG Mh-B3 TCAATGTTTCTGCAGTTTCG Mh-FIP TGAAAAAATATTGCTGGCGTCCACCTTAATCGGGTTTAAGACT Mh-BIP TCTATCCTTATCGGTGGATCACTCCACAAATTATCGCAGTTAGCT Mh-LB GGCTCGTGGATCCATGAAGAACG	Peng et al. (2017)

1.4.2. Sequenciamento

A caracterização do genoma dos fitonematoides pode ajudar a elucidar aspectos relacionados ao parasitismo e direcionar estratégias de manejo (LOPES et al., 2014). Além disso, o sequenciamento parcial ou total do genoma de determinada espécie pode facilitar o desenvolvimento de diagnósticos específicos. Desde seu advento na década de 1970 até os dias atuais, o método de Sanger (SANGER et al., 1977) tem sido o método padrão de sequenciamento de DNA. A partir de 2005, novos sequenciadores foram criados, dando origem à era das tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS). Com esses equipamentos, o número de dados genômicos tende a crescer muito nos próximos anos (SEESSAO et al., 2016). Isso porque os novos sequenciadores (2^a, 3^a e 4^a gerações) são mais rápidos do que os que usam o método de Sanger. No entanto, esses novos equipamentos ainda são muito caros. Outro desafio associado às novas tecnologias de sequenciamento é o processamento de grande volume de dados gerados.

Várias espécies de nematoides tiveram parte de seu genoma sequenciado ao longo das últimas décadas (BESNARD et al., 2014; SEESSAO et al., 2016). Essas informações estão disponíveis em bancos de dados, sendo o GenBank o mais popular (www.ncbi.nlm.nih.gov). Além de fragmentos genômicos de várias espécies do nematoide-de-galhas, os genomas completos de *M. incognita* (ABAD et al., 2008) e *M. hapla* (OPPERMAN et al., 2008) já foram sequenciados até o momento. O genoma de *M. incognita* possui 86 Mb e 19.212 genes, enquanto o de *M. hapla* é bem menor, com 54 Mb e 14.420 genes.

1.4.3. Microarranjos de DNA

Nessa técnica, uma sonda (cDNA ou oligonucleotídeo) é hibridizada com uma molécula-alvo marcada com fluoróforo, usualmente um cDNA, produzido a partir da conversão de RNA total ou mRNA extraídos da amostra de interesse. A tecnologia vem se apresentando promissora à identificação em vários campos da ciência (FRANÇOIS et al., 2006; BLOK & POWERS, 2009). Com essa técnica, é possível detectar vários alvos ao mesmo tempo, sem problemas associados à competição pela amplificação de alvos distintos, perdas de

especificidade e dificuldade de separação dos produtos no gel, como podem ocorrer com a PCR multiplex (FRANÇOIS et al., 2006). Além disso, a amplificação de contaminantes que acabam gerando o falso-positivo é outro problema significativo das reações PCR e que não ocorrem com uso da técnica de microarranjos de DNA (FRANÇOIS et al., 2006).

O uso de microarranjos de DNA ainda é limitado em nematologia, mas a utilidade dessa tecnologia na diagnose de *Meloidogyne* já foi comprovada. FRANÇOIS et al. (2006) usaram essa tecnologia para a identificação de *M. chitwoodi*, uma espécie quarentenária em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Microarranjos de DNA também foram desenvolvidos para a detecção de *M. hapla* (SZEMEZ et al., 2005; VAN DOORN et al., 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A taxonomia clássica, baseada em estudos morfológicos e morfométricos, com auxílio de microscópio de luz e os métodos bioquímicos têm sido tradicionalmente utilizados na diagnose de nematoides, incluindo os nematoides das galhas. No entanto, devido ao número limitado de características taxonômicas e o declínio no interesse em taxonomia clássica, observa-se um esforço crescente direcionado no desenvolvimento de diagnóstico baseado em técnicas moleculares. Espera-se que as técnicas moleculares forneçam um diagnóstico rápido e fácil de espécies de *Meloidogyne* spp., permitindo que pesquisadores e profissionais possam utilizar essas técnicas na rotina de um laboratório de fitossanidade. No entanto, para aprimorar a resolução e confiabilidade da filogenética e diagnose, os estudos devem combinar os dados morfológicos e moleculares. As técnicas moleculares não devem ser consideradas de maneira isolada, mas como uma ferramenta de auxílio para a identificação segura e correta das inúmeras espécies de *Meloidogyne*, de acordo com o conceito proposto de taxonomia integrativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J.M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V.C.; CAILLAUD, M.C.; COUTINHO, P.M.; DASILVA, C.; DE LUCA, F.; DEAU, F.; ESQUIBET, M.; FLUTRE, T.; GOLDSTONE, J.V.; HAMAMOUCHE, N.; HEWEZI, T.; JAILLON, O.; JUBIN, C.; LEONETTI, P.; MAGLIANO, M.; MAIER, T.R.; MARKOV, G.V.; MCVEIGH, P.; PESOLE, G.; POULAIN, J.; ROBINSON-RECHAVI, M.; SALLET, E.; SÉGURENS, B.; STEINBACH, D.; TYTGAT, T.; UGARTE, E.; VAN GHELDER, C.; VERONICO, P.; BAUM, T.J.; BLAXTER, M.; BLEVE-ZACHEO, T.; DAVIS, E.L.; EWBANK, J.J.; FAVERY, B.; GRENIER, E.; HENRISSAT, B.; JONES, J.T.; LAUDET, V.; MAULE, A.G.; QUESNEVILLE, H.; ROSSO, M.N.; SCHIEX, T.; SMANT, G.; WEISSENBACH, J.; WINCKER, P. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v.8, p.909-915, 2008.

ADAM, M.A.M.; PHILLIPS, M.S.; BLOK, V.C. Molecular diagnostic key for identification for single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). **Plant Pathology**, v.56, p.190-197, 2007.

AGUDELO, P.; LEWIS, S.A.; FORTNUM, B.A. Validation of a real-time polymerase chain reaction assay for the identification of *Meloidogyne arenaria*. **Plant Disease**, v.95, p.835-838, 2011.

ALI, N.; TAVOILLOT, J.; CHAPUIS, E.; MATEILLE, T. Trend to explain the distribution of root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. associated with olive trees in Morocco. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.225, p.22-32, 2016.

ALMEIDA, E.J.; Soares, P.L.M.; Silva, A.R.; Santos, J.M. Novos registros sobre *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil e estudo morfológico comparativo com *M. incognita*. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.236-241, 2008.

BALDACCI-CRESP, F.; MAUCOURT, M.; DEBORDE, C.; PIERRE, O.; MOING, A.; BROUQUISSE, R.; FAVERY, B.; FRENDO, P. Maturation of nematode-

induced galls in *Medicago truncatula* is related to water status and primary metabolism modifications. **Plant Science**, v.232, p.77-85, 2015.

BELLAFFIORE, S.; JOUGLA, C.; CHAPUIS, E.; BESNARD, G.; SUONG, M.; VU, P.N.; DE WAELE, D.; GANTET, P.; THI, X.N. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. **Comptes Rendus Biologies**, v.338, p.471-483, 2015.

BELLÉ, C.; KULCZYNSKI, S.M.; KUHN, P.R.; CARNEIRO, R.M.D.G.; LIMA-MEDINA, I.; GOMES, C.B. First report of *Meloidogyne ethiopica* parasitizing sugarcane in Brazil. **Plant disease**, PDIS-09-16-1303-PDN, 2016.

BERRY, S.D.; FARGETTE, M.; SPAULL, V.W.; MORAND, S.; CADET, P. Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaeae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, n.3, 168-176, 2008.

BESNARD, G.; JUHLING, F.; CHAPUIS, E.; ZEDANE, L.; LHUILLIER, E.; MATEILLE, T.; BELLAFFIORE, S. Fast assembly of the mitochondrial genome of a plant parasitic nematode (*Meloidogyne graminicola*) using next generation sequencing. **Comptes Rendus - Biologies**, v.337, n.5, p.295-301, 2014.

BLOK, V.C.; POWERS, T.O. Biochemical and molecular identification. In: PERRY, N.R.; MOENS, M.; STARR, J.L. **Root-knot nematodes**. Oxfordshire: MPG Books Group, 2009. Cap.4., p.98-118.

BLOK, V.C.; WISHART, J.; FARGETTE, M.; BERTHIER, K.; PHILLIPS, M.S. Mitochondrial differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. **Nematology**, v.4, p.773-781, 2002.

BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; FARGETTE, M. Comparison of sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root knot nematodes. **Journal of Nematology**, v.29, p.16-22, 1997.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MONTEIRO, J.M.S.; SILVA, U.C.; GOMES, G. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S. **Diagnose de fitonematoídes**. Campinas, SP: Millennium Editora, 2016. Cap.3. p.47-72.

CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M. Additional information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing kiwi and grapevine from Brazil and Chile. **Nematology**, v.6, p.109-123, 2004.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzima dos nematoídes de galha para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, p.35-44, 2001.

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, I.M.O.; SANTOS, M.S.N.A.; ALMEIDA, M.R.A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, v.28, p.177-189, 1996a.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, v.19, n.6, p.555-560, 1996b.

CASTRO, J.M.C., LIMA, R.D.; CARNEIRO, R.M.D.G. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. **Nematologia Brasileira**, v.27, p.1-12, 2003.

CHITWOOD, B.G. Root-knot nematodes - Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.16, p.90-104, 1949.

COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotype and genetic diversity of root-knot nematodes parasitizing *Musa* in Brazil. **Nematology**, v.6, p.85-95, 2004.

CORDEIRO, M.C. Identificação molecular do nematoide de galhas, *Meloidogyne* ssp. Planaltina: Embrapa Cerrados, 20 p., 2008 (Boletim de pesquisa e desenvolvimento 219).

CORREA, V.R.; MATTOS, V.S.; ALMEIDA, M.R.A.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.S.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. **Plant Pathology**, v.63, p.476-483, 2014.

DE LEY, I.T.; DE LEY, P.; VIERSTRAETE, A.; KARSSSEN, G.; MOENS, M.; VANFLETEREN, J. Phylogenetic analyses of *Meloidogyne* small subunit rDNA. **Journal of Nematology**, v.34, p.319–327, 2002.

DE LUCA, F.; REYES, A.; VERONICO, P.; Di VITO, M.; LAMBERTI, F.; DE GIORGI, C. Characterization of the (GAAA) microsatellite region in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. **Gene**, v.293, p.191-198, 2002.

DONG, K.; DEAN, R.A.; FORTNUM, B.A.; LEWIS, S.A. A species-specific DNA probe for the identification of *Meloidogyne hapla*. **Nematropica**, v.31, p.7-23, 2001a.

DONG, K.; DEAN, R.A.; FORTNUM, B.A.; LEWIS, S.A. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. **Nematropica**, v.31, n.2, p.271-280, 2001b.

EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H.H. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: NICKLE, W.R. **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.191-274.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v.22, p.10–15, 1990.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). **Journal of Nematology**, v.17, p.6-20, 1985.

FARGETTE, M. Use of the esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. 2. Esterase phenotype observed in West African populations and their characterization. **Revue de Nématologie**, v.10, p.45-56, 1987.

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODHOL, A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. **Journal Fish Biology**, v.47, suppl.A, p.103-126, 1995.

FERRAZ, L.C.C.B. Brazil. In: SOUZA, R.M. (Ed.). **Plant parasitic nematodes of coffee**. New York: APS Press & Springer, p.225-248, 2008.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FRANCOIS, C.; KEBDANI, N.; BARKER, I.; TOMLINSON, J.; BOONHAM, N.; CASTAGNONE-SERENO, P. Towards specific diagnosis of plant-parasitic nematodes using DNA oligonucleotide microarray technology: a case study with the quarantine species *Meloidogyne chitwoodi*. **Molecular and Cellular Probes**, v.20, p.64-69, 2006.

FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.; D'ARC L. Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016, 2 edição, p.257-296.

GARCÍA, L.E.; SÁNCHEZ-PUERTA, M.V. Comparative and evolutionary analyses of *Meloidogyne* spp. based on mitochondrial genome sequences. **PLoS ONE**, v.10, n.3, e0121142, 2015.

HAN, H.; CHO, M.R.; JEON, H.Y.; LIM, C.K.; JANG, H.I. PCR-RFLP identification of three major meloidogyne species in Korea. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.7, n.2, p.171–175, 2004.

HTAY, CC.; PENG, H.; HUANG, W.; KONG, L.; HE, W.; HOLGADO, R.; PENG, D. The development and molecular characterization of a rapid detection method for Rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*). **European Journal of Plant Pathology**, v.146, n.2, p.281-291, 2016.

HU, M.X.; ZHUO, K.; LIAO, J.L. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. **Phytopathology**, v.101, n.11, p.1270-7, 2011.

HUGALL, A.; STANTON, J.; MORITZ, C. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. **Molecular and Biological Evolution**, v.16, p.157-164, 1999.

HUNT D.J.; HANDOO, Z.A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. **Root-knot nematodes**. Wallingford: CAB International, 2009. Cap.3, p.55-88.

INOMOTO, M.M. Técnicas clássicas de diagnose de fitonematoides In: OLIVEIRA, C.M. G.; SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas, SP: Millennium Editora, 2016. Cap.13., p.259-280.

JANATI, A.; BERGÉ, J.B.; TRIANTAPHYLLOU, A.C.; DALMASSO, A. Nouvelles données sur l'utilisation des isoesterases pour l'identification des *Meloidogyne*. **Revue de Nematologie**, v.5, p.147–154, 1982.

JANSSEN, T.; KARSSSEN, G.; VERHAEVEN, M.; COYNE, D.; BERT, W. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. **Scientific Reports**, v.6, sp.22591, 2016.

JOSEPH, S.; MEKETE, T.; DANQUAH, W.B.; NOLING, J. First report of *Meloidogyne haplanaria* infecting *Mi*-resistant tomato plants in Florida and its molecular diagnosis based on mitochondrial haplotype. **Plant Disease**, v.100, n.7, p.1438-1445, 2016.

KIEWNICK, S.; FREY, J.E.; BRAUN-KIEWNICK, A. Development and validation of LNA-based quantitative real-time PCR assays for detection and identification of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in complex DNA backgrounds. **Phytopathology**, v.105, n.9, p.1245-1249, 2015.

KIEWNICK, S.; HOLTERMAN, M.; VAN DEN, E.S.; VAN, M.H.; FREY, J.E.; HELDER, J. Comparison of two short DNA barcoding loci (COI and COII) and two longer ribosomal DNA genes (SSU & LSU rRNA) for specimen identification among quarantine root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and their close relatives. **European Journal Plant Pathology**, v.140, p.97-110, 2014.

KIEWNICK, S.; WOLF, S; WILLARETH, M.; FREY, J.E. Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. **Nematology**, v.15, p. 891-894, 2013.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n.2-3, p.95-125, 2006.

KUMARI, S.; DECRAEMER, W.; De LUCA, F.; TIEFENBRUNNER, W. Cytochrome c oxidase subunit 1 analysis of *Xiphinema diversicaudatum*, *X. pachtaicum*, *X. simile* and *X. vuittenezi* (Nematoda, Dorylaimida). **European Journal of Plant Pathology**, v.127, p.493-499, 2010.

LANDA, B.B.; PALOMARES RIUS, J.E.; VOVLAS, N.; CARNEIRO, R.M.D.G.; MALEITA, C.M.N.; ABRANTES, I.M. de O. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. **Plant Disease**, v.92, p.1104-1110, 2008.

LIMA, R.M.G. Polimorfismos de microssatélites em DNA de eqüinos e seu uso na determinação de parentesco em animais da raça mangalarga machador. 1998, 91p. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

LONG, H.; LIU, H.; XU, J.H. Development of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. **Acta Phytopathology Sinica**, v.36, p.109-115, 2006.

LOPES, E.A.; FERREIRA, P.A.; DALLEMOLE-GIARETTA, R. Variabilidade genética em fitonematoides. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W.C.; RODRIGUES, F.A. **O essencial da Fitopatologia: Controle de doenças de plantas**. 1ed. Viçosa: UFV/DFP, v.1, p.99-116, 2014.

MATIOLI, S.R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202p.

MENG, Q.P.; LONG, H.; XU, J.H. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. **Acta Phytopathologica Sinica**, v.34, p.204-210, 2004.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciências Des**, n.5, p.14-17, 1998.

MIN, Y.Y.; TOYOTA, K.; SATO, E. A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real-time PCR. **Nematology**, v.14, p.265-276, 2012.

MOENS, M.; PERRY, R.N.; STARR, J.L. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, N.R.; MOENS, M. STARR, J.L. **Root-knot nematodes**. Oxfordshire: MPG Books Group, 2009, Cap.1, p.1-17.

MOREIRA, H.L.M. Análise da estrutura de plantéis e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélites. 1999. 112f. Tese (Doutorado em Ciências) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Porto Alegre, 1999.

MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J.M.C.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.M.D.G. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. **Nematology**, v.10, p.897-909, 2008.

NIU, J.H.; JIAN, H.; GUO, Q.X.; CHEN, C.L.; WANG, X.Y.; LIU, Q.; GUO, Y.D. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. **Plant Pathology**, v.61, n.4, p.809-819, 2012.

NIU, J.H.; GUO, Q.X.; JIAN, H.; CHEN, C.L.; YANG, D.; LIU, Q.; GUO, Y.D. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. **Crop Protection**, v.30, n.8, p.1063-1069, 2011.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.12, p.e63, 2000.

NUNN, G. Nematode molecular evolution. An investigation of evolutionary patterns among nematodes based upon DNA sequences. Ph.D. dissertation, University of Nottingham, UK, 1992.

OLIVEIRA, C.M.G.; MONTEIRO, A.R.; BLOK, V.C. Morphological and molecular diagnostics for plant parasitic nematodes: working together to get the identification done. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.65-73, 2011.

OPPERMAN, C.H.; BIRD, D.M.; WILLIAMSON, V.M., ROKHSAR, DAN S.; BURKE, M.; COHN, J.; CROMER, J.; DIENER, S.; GAJAN, J.; GRAHAM, S.; HOUFEK, T.D.; LIU, Q.; MITROS, T.; SCHAFF, J.; SCHAFFER, R.; SCHOLL, E.; SOSINSKI, B.R.; THOMAS, V.P.; WINDHAM, E. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.14802-14807, 2008.

ORUI, Y. Species identification of *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) in Japan by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). **Japanese Journal of Nematology**, v.29, p.7-15, 1999.

PAIS, C.S.; ABRANTES, I.M. Esterase and malate dehydrogenase phenotypes in Portuguese populations of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v.21, p.342-346, 1989.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, p.985-993, 1993.

PENG, H.; LONG, H.; HUANG, W.; LIU, J.; CUI, J.; KONG, L.; HU, X.; GU, J.; PENG, D. Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology. **Scientific Reports**, v.7, Article number 44853, 2017.

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, p.619-626, 1997.

PINHEIRO, J.B.; CARVALHO, A.D.F.; VIEIRA, J.V. 2010. Manejo do nematoide-de-galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivos de cenoura na região de Irecê-BA. Brasília: Embrapa Hortaliças, 7p. (Comunicado Técnico 77).

PINHEIRO, J.B.; HENZ, G.P. 2008. Manejo do nematoide-de-galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura da cenoura. Brasília: Embrapa Hortaliças, 7p. (Comunicado Técnico 55).

PONCHEL, F.; TOOMES, C.; BRANSFIELD, K.; LEONG, F.T.; DOUGLAS, S.H.; FIELD, S.L.; BELL, S.M.; COMBARET, V.; PUISIEUX, A.; ROBINSON, P.A.; INGLEHEARN, C.F.; ISAACS, J.D; MARKHAM, A.F. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnology**, v.3, p.18, 2003.

POWERS T.O.; HARRIS T.S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v.25, p.1-6, 1993.

RANDING, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.; SARAH, J.L.; CASTAGNONE-SERENO, P. A species-specific satellite DNA family in the genome of the coffee root nematode *Meloidogyne exigua*: application to molecular diagnosis of the parasite. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.431-437, 2002.

ROBERTS, D.; OLIVEIRA, C. M. G.; NEILSON, R.; BLOK, V. Diagnose molecular de nematoides parasitos de plantas / Molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes. In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas, SP: Millennium Editora, 2016. Cap. 14, p.281-324.

SALLES, G.; BUSO, C.; YAMAGUICHI, A.; MORETZAORN, M.C.; AMARAL, Z.P.S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Brasília: Embrapa Hortaliças 2003 (Circular Técnica 20).

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, M.F.A.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, M.D.G.; MOTA, F.C.; MENDES, A.C.M.; SILVEIRA, N.O.R.; SILVA, J.G.P.; TIGANO, M.S.; CARNEIRO, R.M.D.G. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. **European Journal of Plant Pathology**, v.134, p.671-684, 2012.

SAPKOTA, R.; SKANTAR, A.M.; NICOLAISEN, M.A. TaqMan real-time PCR assay for detection of in root galls and in soil. **Nematology**, v.18, n.2, p.147-154, 2016.

SCHMITZ, B., BURGERMEISTER, W., BRAASCH, H. Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, v.50, p.310-317, 1998.

SEESAO, Y.; GAY, M.; MERLIN, S.; VISCOGLIOSI, E.; ALIOUAT-DENIS, C.M.; AUDEBERT, C. A review of methods for nematode identification. **Journal of Microbiological Methods**, Jun. 2016.

SIDDIQUI, Y.; ALI, A.; NAIDU, Y. Histopathological changes induced by *Meloidogyne incognita* in some ornamental plants. **Crop Protection**, v.65, p.216-220, 2014.

STEFFEN, R.B., Z.I. ANTONIOLLI, G.P. KIST, M. LUPATINI & C.B. GOMES. Caracterização bioquímica do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em lavouras de arroz irrigado na região central do Rio Grande do Sul. **Ciência e Natura**, v.29, n.1, p.37-46, 2007.

SZEMES, M., BONANTS, P., DE WEERDT, M., BANER, J., LANDEGREN, U., SCHOEN, C.D. Diagnostic application of padlock probes – multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. **Nucleic Acids Research**, v.33, p.e70, 2005.

TAYLOR, D.P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, v.20, n.2, p.268-269, 1974.

TENENTE, G.C.M.V.; De LEY, P.; De LEY, I.T.; KARSSSEN, G.; VANFLETEREN, J.R. Sequence analysis of the D2/D3 region of the large subunit rDNA from different *Meloidogyne* isolates. **Nematropica**, v.34, p.1-12, 2004.

- TIGANO, M.S.; SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K., QUEIROZ, P.; SANTOS, M.; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M.; SILVA, J.; CARNEIRO, R.M.D.G. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. **Plant Pathology**, v.59, p.1054-1061, 2010.
- TOUMI, F.; WAEYENBERGE, L.; VIAENE, N.; DABABAT, A.; NICOL, J.M.; OGBONNAYA, F., MOEN, M. Development of two species-specific primer sets to detect the cereal cyst nematodes *Heterodera avenae* and *Heterodera filipjevi*. **European Journal of Plant Pathology**, v.136, p.613-624, 2013.
- TOYOTA, K.; SHIRAKASHI, T.; SATO, E.; WADA, S. & YU, Y.M. Development of a real-time PCR method for the potato-cyst nematode *Globodera rostochiensis* and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.54, p.72-76, 2008.
- TRUDGILL, D.L. AND BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.53-77, 2001.
- VAN DOORN, R.; SZEMES, M.; BONANTS, P.; KOWALCHUK, G.A.; SALLES, J.F.; ORTENBERG, E.; SCHOEN, C.D. Quantitative multiplex detection of plant pathogens using a novel ligation probe-base system coupled with universal, high-throughput real-time PCR and OpenArrays. **BMC Genomics**, v.8, p.276, 2007.
- VERONICO, P.; De LUCA, F.; De GIORGI, C. Molecular dissection of the rDNA array and of the 5S rDNA gene in *Meloidogyne artiellia*: phylogenetic and diagnostic implications. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, n.3, p.177-183, 2004.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- WILLIAMSON, V.M.; CASWELL CHEN, E.P.; WESTERDAHL, B.B.; WU, F.F.; CARYL, G. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. **Journal of Nematology**, v.29, p.9-15, 1997.

WISHART, J.; PHILLIPS, M.S.; BLOK, V.C. Ribosomal intergenic spacer: a PCR diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla*. **Phytopathology**, v.92, p.884-892, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, n.1, p.1-16, 2002.

ZHAO, Z.Q.; YE, W.M.; GIBLIN-DAVIS, R.M.; LI, D.; THOMAS, W.K. Morphological and molecular analysis of six *Aphelenchoidids* from Australian conifers and their relationship to *Bursaphelenchus* (Fuchs, 1937). **Nematology**, v.10, p.663-678, 2008.

ZIJLSTRA, C.; VAN HOOFF, R.A. A multiplex real-time polymerase chain reaction (TaqMan) assay for the simultaneous detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. **Phytopathology**, v.96, n.11, p.1255-1262, 2006.

ZIJLSTRA, C. 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**, v.106, p.283-290, 2000.

ZIJLSTRA, C.; LEVER, A.E.M.; UENK, B.J.; VAN SIFHOUT, C.H. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. **Phytopathology**, v.85, p.1231-1237, 1995.

CAPÍTULO II

Identificação de espécies de *Meloidogyne* na cultura da cenoura nas três principais regiões produtoras do estado de Minas Gerais

RESUMO

Nematóides do gênero *Meloidogyne*, comumente conhecidos como nematoide-de-galhas, são um dos principais fatores limitantes à produção de cenoura (*Daucus carota*). Os danos à cultura da cenoura incluem principalmente a deformação das raízes, tornando-as inviáveis para comercialização. Apesar da importância do nematoide-de-galhas para a cultura da cenoura, não há nenhum levantamento sistemático publicado até o momento, sobre a distribuição do patógeno, em Minas Gerais, um dos principais pólos produtores dessa hortaliça no Brasil. Com o objetivo de caracterizar e identificar as principais espécies de *Meloidogyne* spp. presentes em lavouras no estado de MG, amostras de raízes e solo foram coletadas em áreas de cultivo de cenoura infestadas por *Meloidogyne* em localidades do Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro e Campo das Vertentes. Os nematoides foram extraídos do solo e das raízes e conservados em geladeira. Amostras de raízes e de solo foram usadas para multiplicação do patógeno em tomateiros cultivados em casa de vegetação. A identificação das espécies foi realizada por análise do padrão perineal, eletroforese de isoenzimas e caracterização molecular através de amplificação com primers SCAR espécie-específico. As espécies encontradas foram *M. incognita*, *M. javanica* e *M. polycephannulata*. *M. incognita* foi a espécie mais frequente, ocorrendo em 9 amostras (60%), seguida de *M. javanica* (26,6%). *M. incognita* foi identificado em amostras provenientes das três regiões, enquanto *M. javanica* em amostras do Alto Paranaíba e Campo das Vertentes. No Alto Paranaíba foi encontrada uma população de *M. polycephannulata*.

Palavras-chave: fitonematoides, esterase, perineal, PCR/ primers SCAR, nematoide-de-galhas.

ABSTRACT

Nematodes of the genus *Meloidogyne*, commonly known as root-knot nematodes, are one of the main limiting factors for carrot production (*Daucus carota*). The damages to the carrot crop mainly include the deformation of the roots, making them unviable for commercialization. Despite the importance of the root-knot nematode for the carrot crop, there is no systematic study published so far on the distribution of the pathogen in Minas Gerais, one of the main producing states of this vegetable in Brazil. In order to characterize and identify the main species of *Meloidogyne* spp. present in crops in the state of MG, root and soil samples were collected in carrot cultivation areas infested by *Meloidogyne* in Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro and Campo das Vertentes. The nematodes were extracted from soil and roots and stored in a refrigerator. Root and soil samples were used for multiplication of the pathogen in tomato plants grown in greenhouse. The identification of the species was performed by perineal pattern analysis, isoenzyme electrophoresis and molecular characterization through amplification with species-specific SCAR primers. The species found were *M. incognita*, *M. javanica* and *M. polycephannulata*. *M. incognita* was the most frequent species, occurring in 9 samples (60%), followed by *M. javanica* (26.6%). *M. incognita* was identified in samples from the three regions, while *M. javanica* in samples from Alto Paranaíba and Campo das Vertentes. In Alto Paranaíba a population of *M. polycephannulata* was found.

Key words: Phytonematoids, esterase, perineal pattern, PCR / SCAR primers, root-knot nematode.

1. INTRODUÇÃO

A cenoura (*Daucus carota*) é uma hortaliça da família *Apiacea*, do grupo das raízes tuberosas, apresenta alto conteúdo de vitamina A (12.000 UI/100 g), textura macia e paladar agradável. Além do consumo *in natura*, é utilizada como matéria prima pelas indústrias processadoras de alimentos, que a comercializam na forma de seleta de legumes, alimentos infantis e sopas instantâneas (EMBRAPA, 2004). A produção de cenoura é estimada em 750 mil toneladas por ano, cultivada em mais de 20 mil ha distribuídos entre os estados produtores da Bahia, Minas Gerais, Paraná e São Paulo (VILELA & BORGES, 2008). Em Minas Gerais, os pólos produtores são Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro e Campos das Vertentes.

Inúmeros fatores reduzem a produtividade da cultura da cenoura, entre eles, destacam-se mais de quinze doenças, causadas por fungos, vírus, bactérias e nematoides. Destas, um número relativamente pequeno é responsável pela maior parte dos danos ocorridos na cultura, destacando-se os nematoides (LOPES et al., 2008). No Brasil, os problemas mais significativos são resultantes do ataque do nematoide-de-galhas (*Meloidogyne* spp.), em especial, as espécies *M. incognita* e *M. javanica*, que são amplamente distribuídas (PINHEIRO et al., 2010). *Meloidogyne hapla* e *Meloidogyne arenaria* também já foram relatados, mas em áreas isoladas (PINHEIRO et al., 2010).

Após a penetração nas raízes, o nematoide-de-galhas induz alterações fisiológicas na planta, principalmente hipertrofia e hiperplasia na região do córtex (PINHEIRO et al., 2010). A hipertrofia celular resulta na formação de células-gigantes, localizadas próximo à região bucal do patógeno (SIDDIQUI et al., 2014). Diversas alterações morfológicas, bioquímicas e anatômicas se desenvolvem. Proliferação de organelas, núcleos, invaginações da membrana celular, aumento da espessura da parede celular e metabolismo intensificado, composição de solutos e a pressão da parede celular são alteradas, bem como a necessidade de ATP e, aparentemente, de substâncias transportadoras de sacarose e aminoácidos, que são utilizadas na nutrição do nematoide (BALDACCI-CRESP et al., 2015). Todas essas modificações levam a obstrução dos feixes vasculares, impedindo o fluxo normal de fotoassimilados, água e nutriente, prejudicando o desenvolvimento da planta (SIDDIQUI et al., 2014).

A intensa formação de galhas leva à deformação das raízes, produzindo bifurcações e redução de tamanho (Figura 1A, B e C). A planta, no entanto, provém modificações físicas e químicas nas raízes a fim de reagir ao ataque do nematoide. Em alguns casos, não ocorre redução significativa na massa da raiz em decorrência do ataque de nematoides, porém, a alteração no seu formato tem interferência direta na classificação comercial do produto, resultando em descarte e enorme desperdício (PINHEIRO & HENZ, 2008; PINHEIRO et al., 2010).

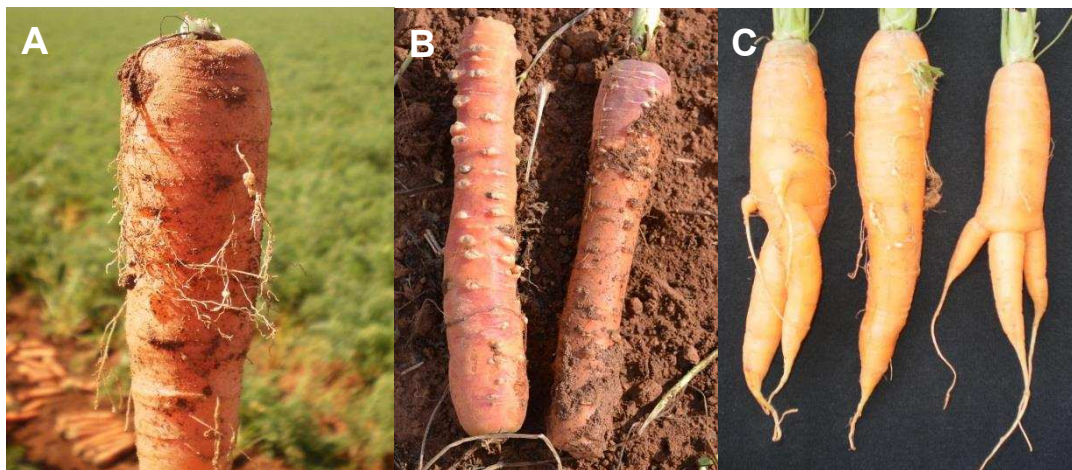


Figura 1- Presença de galhas nas raízes secundárias (A) e na raiz principal acarretando alterações com aspecto pipoca (B); bifurcações nas raízes de cenouras (C) causadas pela injúria por nematoides-de-galhas (*Meloidogyne* spp.).

Fotos: LOPES, E.A.

As condições ambientais predominantes nas principais áreas de cultivo associadas à suscetibilidade de cultivares favorecem a ocorrência da meloidoginose (VILELA & BORGES, 2008). Além do mais, os nematoides são organismos de manejo difícil. A combinação de diferentes táticas de manejo, incluindo práticas culturais (rotações com culturas não hospedeiras e o uso de culturas de cobertura que favoreçam o incremento na população de antagonistas dos nematoides), cultivares resistentes, e tratamento químico do solo, se necessário, geralmente permitem controle razoável do nematoide-de-galhas (PINHEIRO et al., 2010). A extensão deste sucesso, entretanto, depende da identificação da espécie do nematoide e da determinação da densidade populacional do patógeno no solo (MITKOWSKI & ABAWI, 2003).

O cultivo de cenoura ocorre mesmo em áreas com histórico de ocorrência do nematoide-de-galhas, principalmente nas regiões mineiras do Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro, dois importantes pólos produtores da hortaliça, onde poucas áreas isentas do patógeno estão disponíveis para cultivo (VILELA & BORGES, 2008). Diante da importância da doença na cultura da cenoura, o conhecimento da distribuição geográfica e a identificação acurada das espécies prevalentes em áreas produtoras são importantes para o delineamento de estratégias de manejo.

As espécies de *Meloidogyne* são rotineiramente identificadas usando a técnica de eletroforese de isoenzimas (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLOU, 1990; CARNEIRO & ALMEIDA, 2001) ou a observação de padrões perineais (HARTMAN & SASSER, 1985). A análise da configuração perineal, ou simplesmente corte perineal, foi muito utilizada como procedimento de rotina no passado, sendo sucedido em importância pela eletroforese de isoenzimas. A primeira técnica, embora ainda seja útil, requer habilidade manual do laboratorista e pode resultar em identificações não acuradas, em razão da similaridade entre padrões perineais de espécies distintas, como, por exemplo, *M. incognita* e *Meloidogyne enterolobii* (CORDEIRO et al., 2008). A eletroforese de isoenzimas possibilita identificação mais acurada que a análise do corte perineal e é relativamente de simples execução. Em ambos os casos, a identificação das espécies depende de fêmeas na amostra e, todavia, juvenis de segundo estágio são os mais abundantes no solo. Atualmente, ferramentas moleculares, como amplificação em cadeia da polimerase (PCR), vêm sendo cada vez mais utilizadas. Isto porque esta técnica permite a amplificação de pequenas quantidades de DNA que podem ser extraídas de nematoides únicos, ovos, fêmeas ou juvenis. Além disso, a maioria dos laboratórios de diagnose está preparada para a realização da PCR, sendo esta técnica a mais aplicável para a identificação de espécies (YE et al., 2015).

As principais espécies do nematoide-de-galhas que causam prejuízos em cenoura em todo o mundo são *M. javanica*, *M. incognita* (KOFOID & WHITE, 1919) Chitwood, *M. hapla* Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *Meloidogyne fallax* Karssen, *Meloidogyne chitwoodi* Golden, Bannon, Santo & Finley (KARSSSEN, 1996; DAVIS & RAID, 2002; WALKER, 2004; WESEMAEL & MOENS, 2008). No Brasil, nenhum levantamento sistemático foi realizado até o

momento, visando à caracterização das espécies do patógeno na cultura da cenoura. De forma geral, assume-se que *M. incognita* e *M. javanica* são as mais comumente encontradas no campo (NEVES et al., 2011). Para elucidar a distribuição das espécies de *Meloidogyne* em cenoura cultivada em Minas Gerais, foram coletadas amostras em áreas infestadas nos três pólos produtores do estado e as principais espécies foram identificadas através de técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares de diagnose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Coleta das populações do nematoide-de-galhas

As populações de *Meloidogyne* foram coletadas em áreas com histórico de ocorrência recente de danos, nos três principais pólos de produção de cenoura do estado de Minas Gerais (Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro e Campo das Vertentes). Os locais de coleta foram georreferenciados com auxílio de receptor GPS (Garmin, modelo Etrex H), conforme apresentado na figura 1.

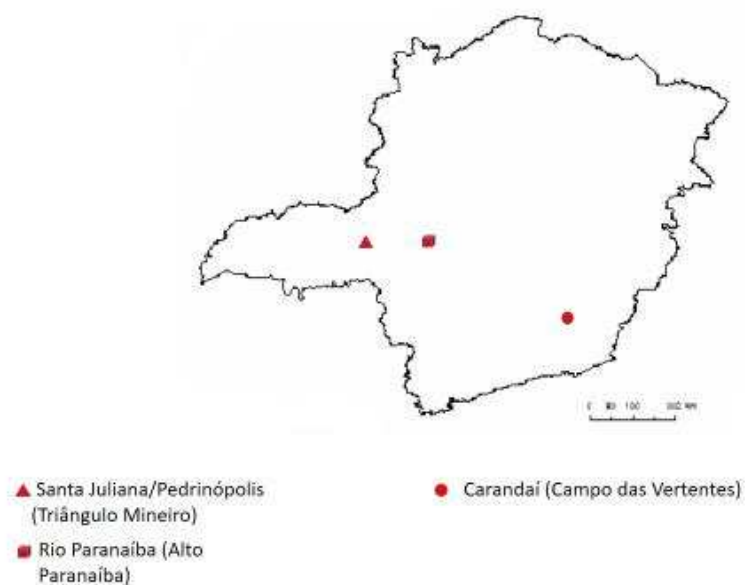


Figura 2 – Localização das regiões de coleta das populações de nematoides-de-galhas no estado de Minas Gerais.

Foram coletadas amostras de raízes com sintomas da doença e porções de solo adjacente a essas raízes. As amostras de uma mesma área foram reunidas para a obtenção de amostra composta de 500 cm³ de solo e 500 g de raízes. Os solos foram acondicionados em sacos plásticos e as raízes em sacos de papel. Caixas de isopor foram utilizadas para acondicionamento e transporte das amostras ao Laboratório de Fitopatologia, Bioquímica e Genética Molecular da Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba (UFV/CRP), onde foram identificadas e armazenadas (Tabela 1).

Tabela 1- Região de coleta, município, dados geográficos e código de identificação das amostras de solo e raízes contendo nematoides-de-galhas.

Região de Coleta	Município	Dados Geográficos	Código de Identificação
Alto Paranaíba	Rio Paranaíba	S 19°27'41,2" W 46°12'59,3"	RIO03
Alto Paranaíba	Rio Paranaíba	S 19°27'56,5" W 46°12'42,8"	RIO04
Alto Paranaíba	Rio Paranaíba	S 19°27'18,7" W 46°12'36,3"	RIO05
Alto Paranaíba	Rio Paranaíba	S 19°26'27,2" W 46°09'41,1"	RIO06
Alto Paranaíba	Rio Paranaíba	S 19°28'09,7" W 46°15'4,8"	RIO09
Alto Paranaíba	Rio Paranaíba	S 19°12'35,3" W 46°07'59,2"	RIO10
Alto Paranaíba	Rio Paranaíba	S 19°12'35,3" W 46°07'59,2"	RIO11
Alto Paranaíba	Rio Paranaíba	S 19°28'84,5" W 46°18'73,9"	RIO16
Campo das Vertentes	Carandaí	S 20°57'27,4" W 43°54'14,8"	CAD01
Campo das Vertentes	Carandaí	S 20°57'59,7" W 43°54'14,8"	CAD02
Campo das Vertentes	Carandaí	S 20°58'08,9" W 43°54'13,8"	CAD09
Campo das Vertentes	Carandaí	S 20°57'53,1" W 43°53'40,9"	CAD10
Triângulo Mineiro	Santa Juliana	S 19°18'22,1" W 47°34'05,6"	TRI06
Triângulo Mineiro	Santa Juliana	S 19°18'14,3" W 47°29'07,1"	TRI07
Triângulo Mineiro	Santa Juliana	S 19°22'12,4" W 47°31'07,6"	TRI08

2.2- Extração, multiplicação e manutenção dos inóculos

As amostras de solo foram homogeneizadas e uma fração de 100 cm³ foi separada para a extração de nematoides pelo método de flutuação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964). O restante do solo foi armazenado em geladeira, a 4°C, para eventual utilização. Os inóculos foram multiplicados e mantidos em plantas de tomate, variedade Santa Cruz Kada, cultivadas em vasos de 3 L (três repetições por população), conduzidas em casa de vegetação localizadas na Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba e no Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus* Bambuí. O substrato empregado para cultivo do tomateiro foi composto de solo e areia na proporção de 1:1 (v:v), previamente autoclavado em 2 ciclos com intervalo de 24 horas a 120°C por 1 h.

A renovação das plantas com novo substrato ocorreu em intervalos de 30 a 60 dias.

2.3. Identificação das espécies de *Meloidogyne*

2.3.1 Identificação por morfologia da região perineal

A partir das populações de *Meloidogyne* spp. de cada amostra, procedeu-se a caracterização morfológica de fêmeas adultas pela configuração da região perineal. Os cortes foram realizados em 10 fêmeas de cada uma das populações e para a identificação utilizou-se observação em microscópio de luz da região posterior do corpo da fêmea. Características como a conformidade e tamanho de estrias, forma do arco dorsal, distância entre o ânus e a vulva, presença de pontuações na região perineal foram comparadas às características descritas na literatura (HARTMAN & SASSER, 1985).

2.3.2. Identificação por eletroforese de isoenzimas

Para a análise do polimorfismo de isoenzimas por eletroforese, a proteína analisada foi a esterase (EST), a qual permite a identificação de um maior número de espécies de *Meloidogyne*. (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1990; CARNEIRO & ALMEIDA, 2001). Para isso, dez fêmeas adultas do nematoide-de-galhas foram excisadas de raízes com auxílio de estilete de ponta fina e estereomicroscópio. As fêmeas foram transferidas para tubos contendo de 3 a 5 mL do tampão de extração (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001), maceradas com pistilo e aplicadas em cavidade formadas no gel de poliacrilamida. Cultura pura de *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood foi o padrão de referência comparativa entre os fenótipos encontrados no campo. O extrato enzimático de cada amostra foi aplicado em uma cavidade do gel. A identificação dos fenótipos foi realizada através do cálculo da mobilidade relativa (Rm) de cada banda polimórfica comparada ao padrão.

2.3.3. Identificação por PCR e primers SCAR

As espécies de *Meloidogyne* coletadas no campo foram identificadas usando a chave de identificação molecular proposta por ADAM et al. (2007).

Um a dez nematoides (juvenis ou fêmeas) foram transferidos para

microtubos contendo 15 µL de água livre de nuclease e 3 µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi (Promega, Madison, USA). Em seguida, quatro a cinco esferas de vidro de 1 mm foram adicionadas em cada microtubo. Os microtubos foram levados ao amalgamador (Dentomat®, Modelo 600 BR, Degussa, Alemanha) por 30 s a 50/60 Hz para rompimento da cutícula do nematoide. Em seguida, 2 µL de proteinase K (100 mg/mL) foram adicionados a cada microtubo. Por fim, os microtubos foram mantidos a 60°C por 60 min, 95°C por 15 min e 15°C por 2 min. O DNA extraído foi mantido congelado a -20°C.

A amplificação dos fragmentos de DNA por PCR foi realizada em termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Foster City, USA). O volume final de cada reação foi de 12,5 µL, sendo composta por 1,0 µL de DNA do patógeno; 0,5 µL de cada par de *primers* (10 mM); 0,0625 µL de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA); 1,25 µL de dNTP a 2 mM; 0,75 µL de MgCl₂ (25 mM); 2,5 µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi e água livre de nuclease (Promega, Madison, USA) para completar o volume. Os conjuntos de primers e as condições de amplificação usadas estão descritos nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em tampão TBE a 90 V usando gel de agarose corado com brometo de etídio ou Sybr Safe (10.000 x, Invitrogen, Carlsbad, USA). Marcadores moleculares 100 pb DNA Ladder RTU (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) foram usados para comparação dos produtos da amplificação. O gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (Wealtec, Model MD-20, 312 mm) e, em seguida, fotografado.

Tabela 5- Primers utilizados na identificação de espécies de *Meloidogyne*. Adaptado de ADAM et al. (2007).

Código	Sequência do primer 5'→3'	Especificidade e referência
194 195	TTAACTTGCCAGATCGGACG TCTAATGAGCCGTACGC	Região 5S-18S rDNA Blok et al. (1997)
Fjav Rjav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC	<i>Meloidogyne javanica</i> - primer específico (SCAR) Zijlstra et al. (2000)
Far Rar	TCGGCGATAGAGGTTAAATGAC TCGGCGATAGACACTACAAACT	<i>Meloidogyne arenaria</i> - primer específico (SCAR) Zijlstra et al. (2000)
MI-F MI-R	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC	<i>Meloidogyne incognita</i> - primer específico (SCAR) Meng et al. (2004)
JMV1 JMV2 JMV hapla	GGATGGCGTGCTTTCAAC TTTCCCCTTATGATGTTTACCC AAAAATCCCCTCGAAAAATCCACC	<i>M. hapla</i> , <i>M. chitwoodi</i> e <i>M. fallax</i> – primer específico (IGS – SCAR) Wishart et al. (2002)

Tabela 6- Condições de amplificação da PCR utilizando diferentes primers para a identificação de espécies de *Meloidogyne*.

Adaptado de ADAM et al. (2007).

45 ciclos				
50°C / 30 seg (194/195, JMV hapla, JMV1 e JMV2)				
61°C/30 seg (Far/Rar)				
64°C/30 seg (Fjav/Rjav)				
62°C/30 seg (MI-F/MI-R)				
94°C 2 min	94°C 30 seg	72°C 90 seg (194/195, JMV hapla, JMV1 e JMV2)	72°C 7 min	10°C ∞
1 min (Fjav/Rjav, MI-F/MI-R, Far/Rar)				

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos estudos de identificação de espécies de *Meloidogyne* utiliza a combinação da configuração perineal e análise bioquímica, baseada no perfil dos fenótipos de esterases. No presente trabalho, utilizaram-se as duas ferramentas para determinar as espécies predominantes do nematoide-de-galhas, em pólos produtores de cenoura importantes do estado de Minas Gerais. Análises moleculares também foram realizadas.

Foram obtidas 15 populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de amostras coletadas em diferentes regiões. As configurações perineais permitiram a identificação preliminar das populações (Tabela 3). *M. incognita* foi a espécie mais frequente, ocorrendo em 9 amostras (60%), seguida de *M. javanica* (26,6%). Somente a amostra CAD02 apresentou mistura de espécies pela análise perineal (Tabela 3). *M. polycephannulata* foi identificado na população RIO16, coletada no Alto Paranaíba.

Tabela 3- Identificação através da configuração perineal de populações de *Meloidogyne* spp. coletadas nas regiões do Alto Paranaíba, Carandaí e Triângulo Mineiro

Código da amostra	Espécies de <i>Meloidogyne</i>
RIO03	<i>Meloidogyne incognita</i>
RIO04	<i>Meloidogyne javanica</i>
RIO05	<i>Meloidogyne incognita</i>
RIO06	<i>Meloidogyne javanica</i>
RIO09	<i>Meloidogyne incognita</i>
RIO10	<i>Meloidogyne javanica</i>
RIO11	<i>Meloidogyne javanica</i>
RIO16	<i>Meloidogyne polycephannulata</i>
CAD01	<i>Meloidogyne incognita</i>
CAD02	<i>Meloidogyne incognita e Meloidogyne javanica</i>
CAD09	<i>Meloidogyne incognita</i>
CAD10	<i>Meloidogyne incognita</i>
TRI06	<i>Meloidogyne incognita</i>
TRI07	<i>Meloidogyne incognita</i>
TRI08	<i>Meloidogyne incognita</i>

As amostras RIO04, RIO06, RIO10 e RIO11 coletadas no Alto Paranaíba e CAD02 coletada no Campo das Vertentes apresentaram arco dorsal baixo e arredondado, estrias suaves e a presença de duas incisuras laterais se

expandindo do setor dorsal para o ventral, características típicas de *M. javanica* (CHITWOOD, 1949), conforme apresentada na figura 3A. Um segundo padrão foi observado na amostra RIO16, também coletada no Alto Paranaíba e esta apresentou arco dorsal achatado a alto, arredondado e amplamente espaçado com estrias grossas, padrão correspondente a *M. polycephannulata* (CHARCHAR et al., 2009) (Figura 3B, C e D). Todas as demais amostras coletadas no Alto Paranaíba (RIO03, RIO05 e RIO09), Campos das Vertentes (CAD01, CAD02, CAD09 e CAD10) e Triângulo Mineiro (TRI06, TRI07 e TRI08) apresentaram as características típicas de *M. incognita*, com o arco dorsal alto e trapezoidal, estrias onduladas e bifurcações nas laterais (TAYLOR & SASSER, 1978) (Figura 3E).

Dentre as quinze populações de *Meloidogyne* spp. estudadas foram identificadas 5 bandas esterásicas (Figura 4) e três fenótipos de esterase, os quais corresponderam às espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. polycephannulata*. O fenótipo isoenzimático de esterase observado para *M. incognita* (Figura 4), é constituído por uma única banda na altura da banda de menor mobilidade do fenótipo de *M. javanica*. O fenótipo J3 de *M. javanica*, apresenta 3 bandas fortes com razão de mobilidade de 1,0, 1,25 e 1,40 (Figura 4). *M. polycephannulata* tem duas bandas, uma forte com R.m. de 1,0 e outra fraca de R.m. 1,05 (Figura 4). Aproximadamente 70% dos resultados bioquímicos obtidos foram semelhantes aos encontrados na análise perineal, confirmando a identidade das populações CAD01, RIO03, RIO05, RIO09, TRI06, TRI07 e TRI08 como sendo *M. incognita*; RIO04, RIO10, RIO06 e RIO11 como *M. javanica* e RIO16 *M. polycephannulata*. Entretanto, a amostra CAD02 apresentou correspondência a mistura de espécies *M. javanica* e *M. incognita*, pela análise perineal e o mesmo ocorreu com as amostras CAD09 e CAD10, mas no perfil esterásico. A mistura de espécies foi relatada por MEDINA (2014) e em outros por ele publicados. Nesse sentido, os resultados de eletroforese são cruciais, pois a análise perineal pode não ser totalmente confiável. Ao se usar a morfologia na caracterização de espécies é muito importante considerar a amplitude de variabilidades, pois existem variações intra-específicas que sofrem influência de outros fatores, como área geográfica, por exemplo (HUNT & HANDOO, 2009).

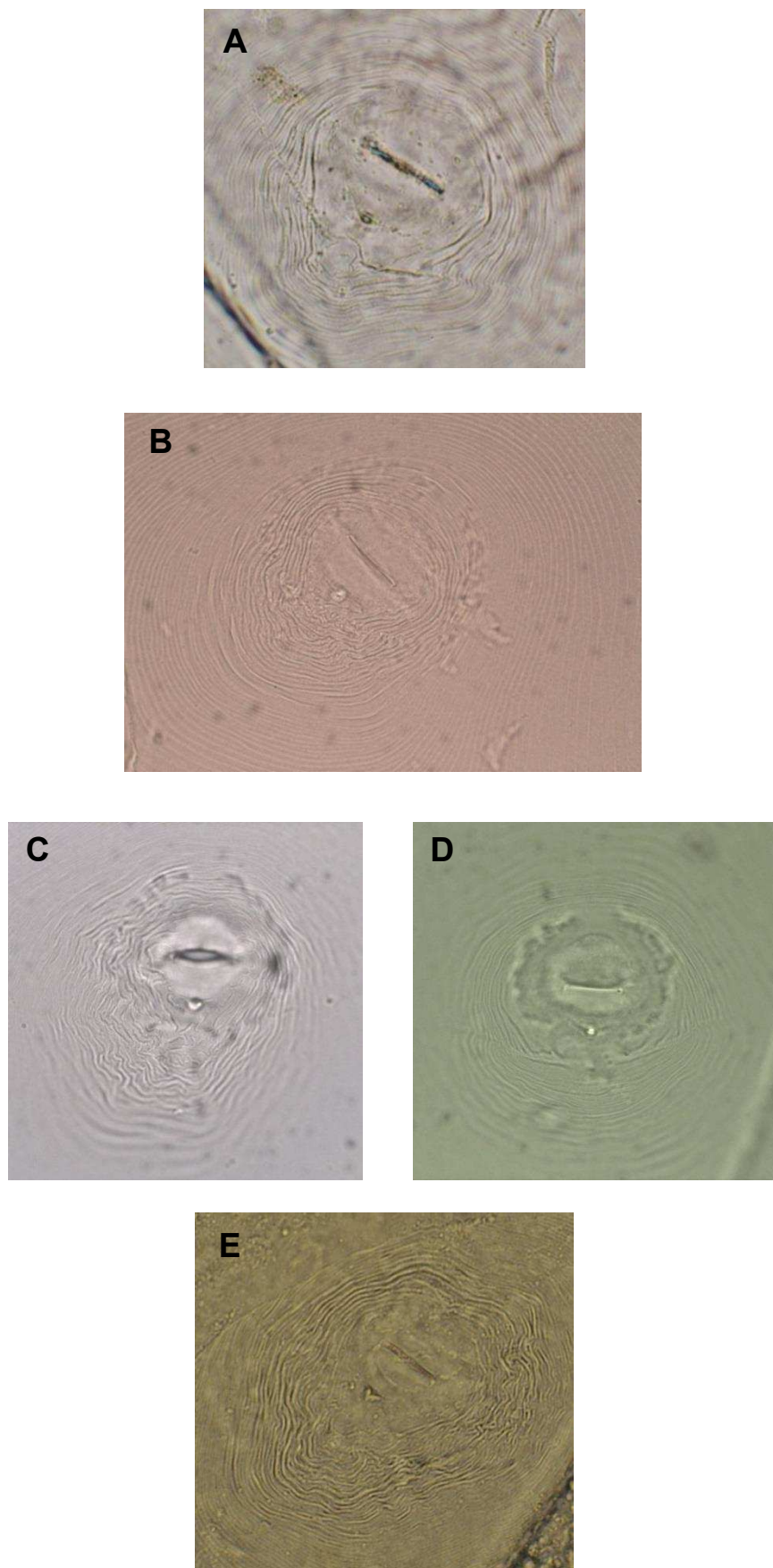
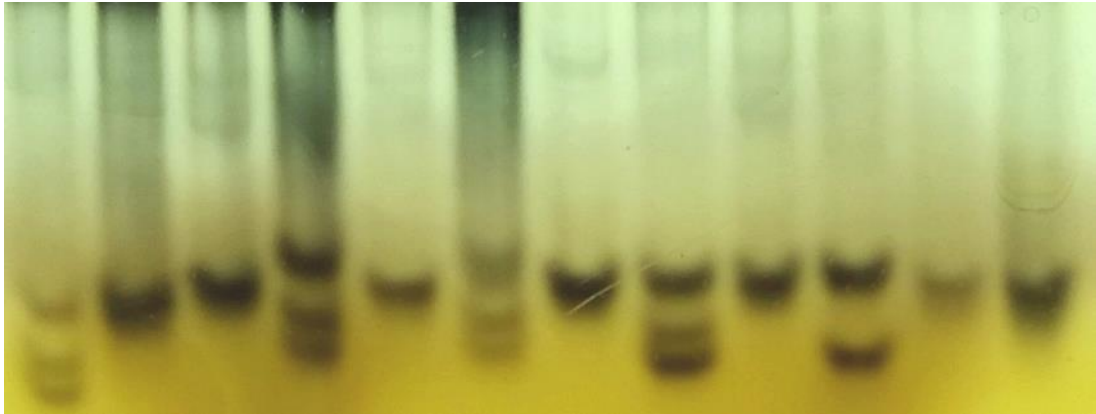


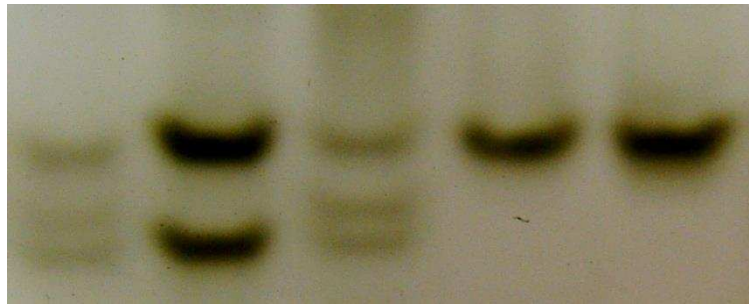
Figura 3 – Padrões perineais de espécies de *Meloidogyne* spp. em áreas de cultivo de cenoura em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. A) *M. javanica*, B, C e D) *M. polycephannulata* e E) *M. incognita*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



N° de bandas	R.m.	<i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. polycephannulata</i>	<i>M. incognita</i>
1	1,40	1			1		1		1			
2	1,25	2			2		2		2			
3	1,05										3	
4	1,00										4	
5	0,95	5	5	5	5	5	5	5	5	5		5

13 14 15 16 17



N° de bandas	R.m.	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
1	1,70					
	1,65					
2	1,60					
	1,55					
3	1,50					
	1,45					
1	1,40	■ 1	■ 1	■ 1		
	1,35					
2	1,30					
	1,25	■ 2	■ 2	■ 2		
3	1,20					
	1,15					
3	1,10					
	1,05					
3	1,00	■ 3	■ 3	■ 3	■ 3	■ 3
	0,95					
	0,90					
	0,85					

Figura 4 – Fenótipos de esterase de 15 populações de *Meloidogyne* spp. coletadas em áreas de cultivo de cenoura em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. 1 e 13: Padrão *M. javanica*; 2: CAD1 (*M. incognita*); 3: CAD2 (*M. incognita*); 4: CAD9 (*M. incognita* e *M. javanica*); 5: RIO3 (*M. incognita*); 6: CAD10 (*M. incognita* e *M. javanica*); 7: RIO5 (*M. incognita*); 8: RIO6 (*M. javanica*); 9: RIO9 (*M. incognita*); 10: RIO11 (*M. javanica*); 11: RIO16 (*M. polycephannulata*); 12: TRI8 (*M. incognita*); 14: RIO04 (*M. javanica*); 15: RIO10 (*M. javanica*); 16: TRI06 (*M. incognita*) e 17: TRI07 (*M. incognita*). R.m.= razão de migração em relação da banda mais lenta (R.m= 1,0) de *M. javanica*.

PCR das amostras coletadas foram realizadas utilizando primers universais D2/D3 e 194/195. No entanto, poucas amostras amplificaram, provavelmente, devido a problemas na extração do DNA dos patógenos. O resultado da análise molecular, utilizando os primers D2/D3 pode ser observado na figura 5.

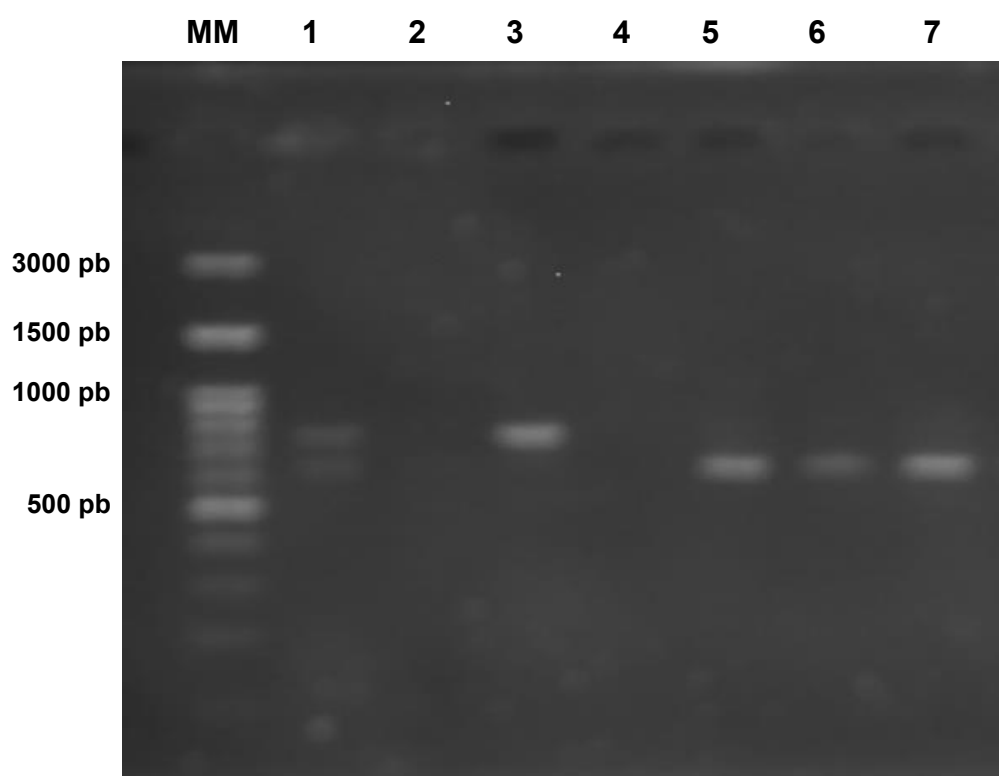


Figura 5 - Produtos de amplificação de populações de *Meloidogyne* spp. com primers universais D2/D3. MM: marcador molecular 100 pb; 1: RIO04; 2: RIO06; 3: RIO09; 4: RIO11; 5: CAD01; 6: CAD02 e 7: controle positivo.

É possível visualizar bandas de produtos da PCR para as amostras RIO04, RIO09, CAD01 e CAD02, demonstrando que a extração do material genético dessas amostras foi eficiente, que o DNA apresentou boa qualidade e que houve sucesso no processo de amplificação. Esse resultado também confirma a presença de nematoide nessas amostras.

As amostras CAD02, RIO06 e RIO11 amplificaram com o primer espécie-específico Fjav/Rjav, apresentando bandas próximas a 720 pb, característica de *M. javanica* (Figura 6). Tais resultados comprovam os encontrados nas análises morfológicas e bioquímicas.

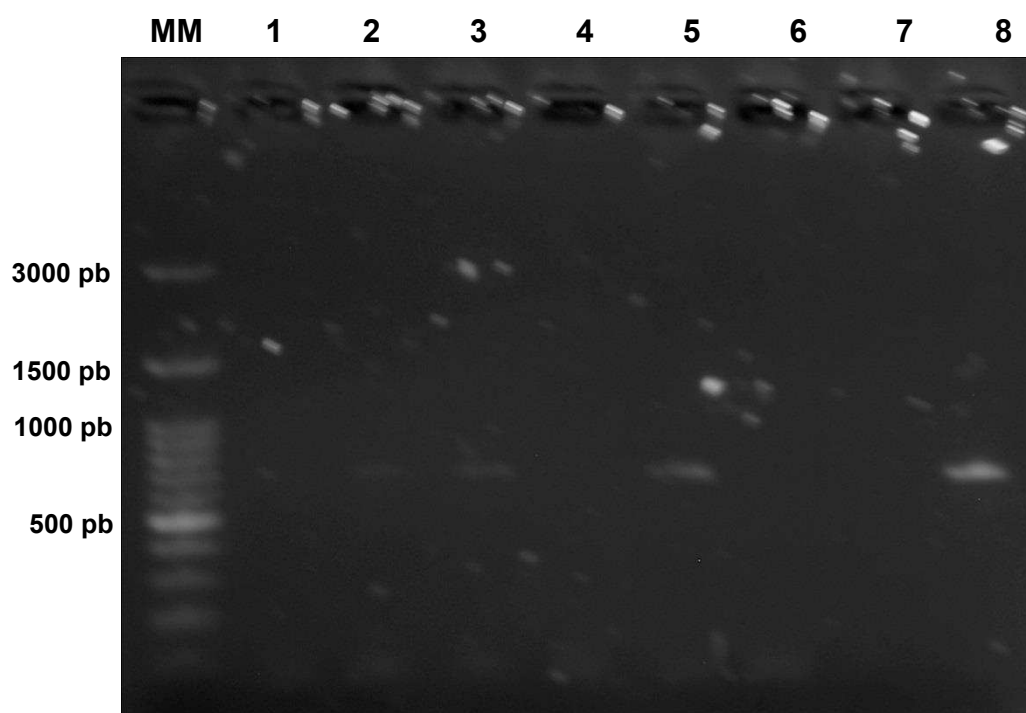


Figura 6 - Produtos de amplificação de populações de *Meloidogyne* spp. com primers espécie-específico para *M. javanica*, Fjav/Rjav. MM: marcador molecular 100 pb; 1 e 2: CAD09; 3 e 4: RIO06; 5 e 6: RIO11; 7: controle negativo e 8: controle positivo.

As reações com o primer MIF/MIR, específico para *M. incognita*, não amplificaram para nenhuma amostra analisada. Tal resultado não era o esperado, já que as populações RIO03, RIO05, RIO09, CAD01, CAD02 e TRI8 identificadas por análise perineal e do perfil esterásico como *M. incognita*, deveriam ter amplificado com primer espécie-específico, MIF/MIR. Uma hipótese a ser considerada nesse caso, é um possível problema com os primers MIF/MIR.

KIEWNICK et al. (2013) relataram diversas falhas ocorridas na identificação de populações de *M. incognita* usando os primers MIF/MIR em seu estudo de caracterização de espécies tropicais.

M. javanica e *M. incognita* são as espécies de fitonematoides mais frequentes em diversas culturas, entre elas a cenoura. Elevados índices populacionais dessas espécies, em geral, afetam a produtividade e medidas de controle devem ser realizadas, afim de minimizar os danos causados por esses microrganismos (DIAS et al., 2010). CHARCHAR et al. (1999) testaram diferentes formas de controle de nematoides, em áreas de cultivo de hortaliças na região de Jaíba, norte de Minas Gerais. Os autores relataram que um levantamento realizado na região, revelou que as espécies, *M. incognita* e *M. javanica*, estavam presentes em populações mistas em 80% das amostras analisadas. Trabalhos realizados em outros locais do Brasil, como microrregiões de cultivo de hortaliças do estado do Ceará, *M. incognita*, *M. enterolobii* e *M. javanica* foram as espécies prevalentes (SILVA et al., 2016). Esses resultados vão ao encontro ao descrito por PINHEIRO et al. (2010), onde *M. javanica* e *M. incognita* foram as duas espécies predominantes em áreas de cultivo de cenoura, na região de Irecê - BA. Segundo esses mesmos autores, *M. hapla* e *M. arenaria* também foram encontrados, porém em áreas isoladas. Em batata, cultivada nos três estados do Sul, um levantamento conduzido por MEDINA (2014) detectou que a espécie *M. javanica* é predominante sobre as demais. GONÇALVES (2014) encontrou *M. incognita* em mais de 70% das amostras levantadas em estudo em áreas de olerícolas no centro-oeste de São Paulo. Elevada incidência das espécies *M. javanica* e *M. incognita* também foram relatadas em áreas de produção comercial de cana-de-açúcar nos estados de São Paulo (DINARDO-MIRANDA & FRACASSO, 2009) e Rio Grande do Sul (BELLÉ et al., 2014).

A predominância das espécies encontradas no presente trabalho, *M. incognita* e *M. javanica*, pode estar relacionada ao seu espectro de hospedeiros. Elas são conhecidas por parasitar numerosas espécies de plantas cultivadas, em especial hortaliças (CHARCHAR et al., 2009). Culturas anuais, como soja, também tem essas *M. javanica* e *M. incognita* como as principais causadoras de perdas (DIAS et al., 2010). Isso lhes dá vantagem competitiva, uma vez que a técnica de rotação de culturas fica limitada devido ao grande número de espécies

comerciais hospedeiras, o que reduz o intervalo de tempo de ausência do hospedeiro suscetível no campo.

CHARCHAR et al. (2009) detectaram a ocorrência de população em Rio Paranaíba descrita como uma nova espécie de *Meloidogyne*, *M. polycephannulata*. No entanto, tal classificação vem sendo questionada (CARNEIRO et al., 2016; MONTEIRO, 2016). Segundo esses autores, *M. polycephannulata* mostrou-se idêntica a *M. incognita*, partilhando o perfil de esterase I2 e o mesmo fragmento alvo do DNA amplificado pelo par de *primers* (inck14F/R), desenhado para *M. incognita*. Sendo assim, a população corresponderia a uma variante de *M. incognita*. De toda forma há indicativos da presença dessa espécie ou da variante de *M. incognita* na região em estudo, devido ao resultado obtido para a amostra RIO16. A detecção dessa população ocorreu em área diferente da encontrada por CHARCHAR et al. (2009), indicando que *M. polycephannulata* ou uma variante pode estar disseminada na região. Estudos mais aprofundados de caracterização desta população, utilizando morfometria, ferramentas moleculares e comportamento em hospedeiros diferenciadores, são essenciais para elucidar características da espécie e seu parasitismo. Além do mais, tais resultados permitirão um melhor enquadramento taxonômico da população.

4. CONCLUSÃO

As espécies *M. javanica* e *M. incognita* são as predominantes em áreas de cultivo de cenoura localizadas na região do Alto Paranaíba, Campos das Vertentes e Triângulo Mineiro.

Na região do Alto Paranaíba há a presença de *M. polycephannulata* ou uma variante de *M. incognita*. No entanto, mais estudos com tal população se fazem necessários para confirmação dessa inferência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M.A.M.; PHILLIPS, M.S.; BLOK, V.C. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). **Plant Pathology**, v.56, p.190-197, 2007.

BALDACCI-CRESP, F.; MAUCOURT, M.; DEBORDE, C.; PIERRE, O.; MOING, A.; BROUQUISSE, R.; FAVERY, B.; FRENDO, P. Maturation of nematode-induced galls in *Medicago truncatula* is related to water status and primary metabolism modifications. **Plant Science**, v.232, p.77-85, 2015.

BELLÉ, C.; KULCZYNSKI, S.M.; GOMES, C.B.; KUHN, P.R. Fitonematoides associados à cultura da cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul, Brasil. **Nematropica**, v.44, p.207-217, 2014.

BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; FARGETTE, M. Comparison of sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root knot nematodes. **Journal of Nematology**, v.29, p.16–22, 1997.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MONTEIRO, J.M.S.; SILVA, U.C.; GOMES, G. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas, SP: Millennium Editora, 2016. Cap.3. p.47-72.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, p.35-44, 2001.

CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D.; VIEIRA, J.V.; FONSECA-BOITEUX, M.E.; BOITEUX, L.S. *Meloidogyne polycephannulata* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing carrot in Brazil. **Journal of Nematology**, v.41, n.3, p.174-86, 2009.

CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H. *Meloidogyne petuniae* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitic on petunia in Brazil. **Journal of Nematology**, v.31, p.81-91, 1999.

CHITWOOD, B.G. Root-knot nematodes - Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.16, p.90-104, 1949.

CORDEIRO, M.C. Identificação molecular do nematoide de galhas, *Meloidogyne* ssp. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008, 20p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento 219).

DAVIS, R.M., RAID, R.N. **Compendium of umbelliferous crop diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2002, 75p.

DIAS, W.P.; GARCIA, A.; SILVA, J.F.V.; CARNEIRO, G.E.S. Nematoides em Soja: Identificação e Controle. Londrina: Embrapa Soja, 2010, 8p. (Circular Técnica 76).

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V. Spatial distribution of plant-parasitic nematodes in sugarcane fields. **Scientia Agrícola**, v.66, p.188-194, 2009.

EMBRAPA. **Manual de segurança e qualidade para a cultura da cenoura**. Brasília. Série: Qualidade e Segurança dos Alimentos. Projeto PAS Campo. Convênio CNI/SENAI/ SEBRAE/EMBRAPA, 2004, 61p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/18219/1/MANUALSEGURANCAQUALIDADEParaaculturadacenoura.pdf>> Acesso em: 23/05/2016.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identifications of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**. v.22, n.1, p.10-15, 1990.

GONÇALVES, L.A. Levantamento e manejo de nematoides fitoparasitas em áreas cultivadas com olerícolas na região centro-oeste do estado de São Paulo, 66p. Tese (Doutorado em Agronomia – Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

HARTMAN, R.M.; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Vol. 2. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985, p.69-77.

HUNT D.J.; HANDOO, Z.A. Taxonomy, identification and principal species. In PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. **Root-knot nematodes**, Wallingford, UK: CAB International. 2009, p.55-88.

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

KARSSSEN, G. Description of *Meloidogyne fallax* n. sp., a root-knot nematode from the Netherlands. **Fundamental and Applied Nematology**, v.19, p.593-599, 1996.

KIEWNICK, S.; WOLF, S; WILLARETH, M.; FREY, J.E. Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. **Nematology**, v.15, p. 891-894, 2013.

LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CHARCHAR, J.M. Cenoura (*Daucus carota*) In: Sistema de Produção, Embrapa Hortaliças, 2008. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 19 abr 2016.

MEDINA, I.L.; CASA-COILA, V.H.; GOMES, C.B.; PEREIRA, A.S.; NAZARENO, N.R.X. Ocorrência de *Meloidogyne ethiopica* no Paraná e reação de cultivares de batata ao nematoide das galhas. **Horticultura Brasileira**, v.32, p.463-466, 2014.

MENG, Q.P. et al. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. **Acta Phytopathologica Sinica**, v.34, p.204-210, 2004.

MITKOWSKI, N.A.; ABAWI, G.S. Nematóide de galhas. (Portuguese translation by E.A, Lopes, R. Dallemole-Giaretta and B.S. Vieira, 2011). **The Plant Health Instructor**, 2003. Disponível em: <DOI:10.1094/PHI-I-2011-03-29-01>. Acesso em 24 jan 2017.

MONTEIRO, J.M.S. Caracterização morfológica, enzimática e molecular de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp.: identificação e sinonimização de espécies., 126p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, 2016.

NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; FERNANDES, R.H.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; PARREIRA, D.F. Nematóides na cultura da cenoura: sintomas, disseminação e

principais métodos de controle. Belo Horizonte: EPAMIG, 2011, 5 p. (Circular Técnica, 133).

PINHEIRO, J.B. & HENZ, G.P. Manejo do nematoide-de-galhas (*Meloidogyne* SSP.) na cultura da cenoura. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008, 7p. (Comunicado Técnico 55).

PINHEIRO, J.B.; CARVALHO, A.D.F.; VIEIRA, J.V. Manejo do nematoide-de-galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivos de cenoura na região de Irecê-BA. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010, 7p. (Comunicado Técnico 77).

SIDDIQUI, Y.; ALI, A.; NAIDU, Y. Histopathological changes induced by *Meloidogyne incognita* in some ornamental plants. **Crop Protection**, v.65, p.216-220, 2014.

SILVA, M.C.L.; SANTOS, C.D.G.; SILVA, G.S. Espécies de *Meloidogyne* associadas a vegetais em microrregiões do estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v.47, n.4, p.710-719, 2016.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978, 111p.

VILELA, N.J.; BORGES, I.O. Retrospectiva e situação atual da cenoura no Brasil. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008, 9p. (Circular Técnica, 59).

WALKER, G.E. Associations between carrot defects and nematodes in South Australia. **Australian Plant Pathology**, v.33, p.579-584, 2004.

WESEMAEL, W.; MOENS, M. Quality damage on carrots (*Daucus carota* L.) caused by the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi*. **Nematology**, v.10, p.261-270, 2008.

WISHART, J.; PHILLIPS, M.S.; BLOK, V.C. Ribosomal intergenic spacer: a PCR diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla*. **Phytopathology**, v.92, n.8, p.884-892, 2002.

YE, W.; ZENG, Y.; KERNS, J. Molecular characterization and diagnosis of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from Turfgrasses in North Carolina, USA **Plos One**, v.24, p.1-16, 2015.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D.T.H.M.; FARGET, M. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. **Nematology**, v.2, n.8, p.847-853, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

As técnicas de identificação de *Meloidogyne* são variadas e vêm se aprimorando com o tempo. Identificações morfológicas, como análise de conformação perineal e caracteres morfológicos dos machos, ainda são bastante úteis na solução de diagnósticos. A eletroforese de isozimas é técnica confiável e já adotada na rotina em laboratórios de diagnose. Análises moleculares baseadas em DNA são as mais recentes tecnologias em diagnose de *Meloidogyne*, vêm sendo adotadas em maior escala e tem futuro promissor. O uso integrado de todas essas ferramentas de identificação é muito vantajoso para a acurada diagnose.

M. incognita e *M. javanica* são as espécies predominantes em cultura de cenoura nos pólos produtores de Minas Gerais (Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Campo das Vertentes). Há ocorrência de população que corresponde à *M. polycephannulata* ou variante de *M. incognita*. Para confirmação e solução do diagnóstico dessa população, mais estudos se fazem necessários.