

Técnicas de identificación del nematodo agallador *Meloidogyne*

Identification methods for root-knot nematode *Meloidogyne*

Sergio Miguel Vélez Zambrano^{1,3}; Angel Monserrate Guzmán Cedeño^{1,2}

1 Carrera de Ingeniería Agrícola, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, Km 2.7 Vía Calceta, El Limón, Ecuador.


2 Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí. Ciudadela Universitaria Vía San Mateo. Manta. Manabí, Ecuador

3 Departamento de Fitopatología, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

*Autor correspondiente: smvelez@smvelez.edu.ec (S. M. Vélez Zambrano).

ID ORCID de los autores

S. M. Vélez Zambrano:  <http://orcid.org/0000-0003-3785-7457>

A. M. Guzmán Cedeño:  <http://orcid.org/0000-0001-7057-8068>

RESUMEN

Las especies del género *Meloidogyne*, son de distribución mundial y en general inducen la formación de agallas o nódulos en las raíces de una amplia variedad de plantas, debido a esto, es conocido como "nematodo agallador". Las plantas afectadas manifiestan pérdida de turgencia de las hojas, clorosis y marchitamiento, lo que reduce el rendimiento de los cultivos. En el Ecuador han sido registradas varias especies de *Meloidogyne*, en plantas silvestres y cultivadas. Para el diagnóstico, la identificación de este fitonemátodo inicialmente fue mediante el uso de caracteres morfológicos y posteriormente se incorporó el uso del análisis del patrón de isoenzimas en gel de poliacrilamida. Sin embargo, las técnicas moleculares, que incluyen el análisis de secuencias parciales o totales de uno o más genes de importancia taxonómica, han generado una revolución en la Taxonomía en general, por lo que actualmente es una de las estrategias con enorme potencial tanto para la Identificación como para el estudio genético de *Meloidogyne* spp., debido a su alta sensibilidad y confiabilidad del resultado. El surgimiento de modernas técnicas de identificación permitirá una correcta identificación de *Meloidogyne* spp., lo que contribuye al diseño de adecuadas estrategias de manejo de este nematodo fitopatógeno.

Palabras clave: distribución; nematodo agallador; taxonomía.

ABSTRACT

The species of the genus *Meloidogyne* are globally distributed and generally induce the formation of galls or nodules in the roots of a wide variety of plants, due to this; this nematode is known as "Root knot nematode". The affected plants show loss of turgidity of the leaves, chlorosis and the withering, which leads to a reduction in crop yields. In Ecuador, the presence of several species of the root knot nematode has been registered, in wild and cultivated plants. For the diagnosis, the identification of this plant parasitic nematode, initially was by the use of morphological characters and later was incorporated the use of the analysis of the isoenzyme phenotypes in polyacrylamide gel. However, molecular techniques, which include the analysis of partial or total sequences of one or more genes of taxonomic importance, have generated a revolution in Taxonomy in general, so it is currently one of the strategies with enormous potential for the identification and genetic study of *Meloidogyne* spp. due to its high sensitivity and reliability of the result. The modern identification techniques will allow a correct identification of *Meloidogyne* spp., which contributes to the design of adequate management strategies for this phytopathogenic nematode.

Keywords: distribution; root-knot nematode; taxonomy.

Recibido: 13-02-2022.

Aceptado: 09-05-2022.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

Los nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* son endoparásitos sedentarios de gran importancia económica y constituyen uno de los principales factores limitantes en la productividad de cultivos en países tropicales (Pathak, Keshari & Haider, 2000). *Meloidogyne* spp., se caracteriza por ser un nematodo polífago, capaz de parasitar la mayoría especies de plantas vasculares (Horrigue-Raouani, Chitwood & Chitwood, 2008; Jones *et al.*, 2013; Daramola *et al.*, 2015).

Entre las especies más importantes, se encuentran *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. hapla* (Moens, Perry & Star, 2009). Además, debido al éxito del parasitismo y alta especialización desarrollada en su huésped, así como su permanencia en el suelo y alta tasa de reproducción, son difíciles de erradicar, constituyéndose en un problema fitosanitario de importancia global (Trudgill & Blok, 2001).

Existen diferentes métodos para la identificación de nematodos, a menudo se identifican con base en características morfológicas y morfométricas, en base al hospedante que parasita, su efecto patológico en el hospedante o su origen geográfico. Sin embargo, estos criterios tienen ciertas limitaciones cuando se realizan identificaciones específicas y se hace necesario el empleo de métodos complementarios y confirmatorios más precisos como el caso de las técnicas moleculares (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Rusinque, Inácio, Mota & Nóbrega, 2018).

A pesar de que los métodos morfológicos poseen sus ventajas en algunos casos, para conseguir una correcta identificación, se vuelve necesario y obligatorio el uso de otras técnicas como la caracterización enzimática y técnicas de PCR basada en la amplificación de genes de interés (Eisenback & Hunt, 2009; Oliveira *et al.*, 2016).

La caracterización bioquímica de nematodos es una

metodología muy sensible, que requiere únicamente de la presencia de una hembra joven para poder ser realizada (Carneiro *et al.*, 2005; Oliveira, Oliveira & Gonçalves, 2006). Una comparación de esterases muestra la mayor precisión para poder distinguir las especies de *Meloidogyne*; sin embargo, cuando los perfiles de esterasa son semejantes, los perfiles de malato deshidrogenasa son más precisos en la identificación (Horrigue-Raouani *et al.*, 2008; Hunt & Handoo, 2009; Rusinque *et al.*, 2018).

Los métodos moleculares basados en técnicas como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se caracterizan por la alta sensibilidad y especificidad, (De Weerd *et al.*, 2011; Akyazi, 2013; Daramola *et al.*, 2015; Sapkota *et al.*, 2016). Estos métodos están revolucionando la clasificación taxonómica y el estudio genético de los nematodos, constituyéndose en una herramienta importante en la identificación de nematodos fitoparásitos mediante la amplificación y secuenciamiento de regiones genéticas como ITS (Internal transcribed Spacer), ADNr 18S y 28S D2/D3, Espaciador intergénico (IGS-2); así como el uso de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic) y SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Duarte *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2015).

La implementación del uso de estas herramientas, tiene un efecto en el tiempo que implica un diagnóstico correcto y confiable, lo que permitiría a posterior poder desarrollar técnicas de control más precisas y una disminución de las pérdidas ocasionadas por estos fitoparásitos (Adam *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2016; Rusinque *et al.* 2018).

El objetivo de esta Revisión es dar a conocer aspectos sobre los relatos existentes de *Meloidogyne* spp y las técnicas que se usan en la identificación de este nematodo fitoparásito.

Métodos de identificación de especies de *Meloidogyne* spp.

Morfología y morfometría

La identificación clásica de las especies del género *Meloidogyne* se basa principalmente en caracteres morfológicos y morfométricos. El procedimiento más utilizado para la identificación de especies, era mediante el estudio del patrón perineal en la región posterior del cuerpo de las hembras adultas (Kaur & Attri 2012). Esta región incluye áreas como la de la vulva-ano (el perineo) (Hunt & Handoo, 2009). Los padrones perineales de poblaciones de *M. incognita* y *M. javanica* presentaron leves variaciones morfológicas por la influencia de

factores como el hospedante. Es por eso que también se utilizan características morfológicas de la región cefálica y estilete de la hembra, macho y segundo estadio juvenil; forma y tamaño de la cola del segundo estadio juvenil (Eisenback & Triantophyllu, 1991). Sin embargo, individuos del segundo estadio juvenil son suplementarios y generalmente no se utilizan en la identificación rutinaria de especies (Magunacelaya & Dagnino, 1999).

Debido a la similitud morfológica y morfométrica existente entre especies de *Meloidogyne*, la forma más apropiada de realizar una caracte-

rización es por medio de una combinación de caracteres diferenciales de hembras, machos y juveniles de segundo estadio (Carneiro & Cofcewicz, 2008). Pero en la diferenciación de *Meloidogyne*, los caracteres morfológicos son más utilizados que los morfométricos, ya que estos últimos pueden verse más afectados por las condiciones ambientales (Hunt & Handoo, 2009). Para poder observar y medir las dimensiones de los nematodos fitoparásitos es necesario el uso de equipos adecuados como el microscopio óptico, así como para poder realizar fotografías o diagramas de sus estructuras. También se utiliza el microscopio electrónico de exploración, como una herramienta de trabajo para el diagnóstico, pues permite ver mucho más claramente algunos detalles morfológicos que no pueden ser visualizados correctamente usando el microscopio óptico compuesto; incluso permiten mostrar diferencias morfológicas entre poblaciones o razas de diferentes especies; entre los más importantes caracteres morfológicos revelados por el microscopio electrónico de exploración se encuentran los de la región cefálica en las hembras, machos y juveniles, así como detalles de las estructuras que ocurren en la cutícula y en la región de la cola en hembras y machos (Rodríguez, 2000; Hartman & Sasser, 1985).

Identificación por medio de isoenzimas

La técnica de electroforesis de proteínas e isoenzimas consiste básicamente en que los extractos proteicos solubles se separan en gel de poliacrilamida bajo campo eléctrico de acuerdo con su masa molecular diferente (PAGE). La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2-D-PAGE) también puede utilizarse para una mejor separación. En este caso, las proteínas se separan en la primera dimensión de acuerdo con su punto isoeléctrico y en el segundo de acuerdo con su masa molecular (Carneiro & Almeida, 2001). Los perfiles electroforéticos de isoenzimas, particularmente EST esterasas y la malato deshidrogenasa MDH son diferentes para cada especie (Silva et al., 2016). También se utilizan perfiles de superóxido dismutasa SOD y glutamato-oxaloacetato transaminasa GOT (Karssen & Moens, 2006; Blok & Powers, 2009).

La comparación de perfiles electroforéticos de esterasas muestra una gran consistencia para distinguir especies de *Meloidogyne* spp (Carneiro et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Steffen et al., 2007); sin embargo, los perfiles de malato deshidrogenasa ayudan a identificar cuando los perfiles de esterasa son similares, como, por ejemplo, con *M. incognita* y *M. hapla*. Algunas especies, como *M. arenaria*, muestran varios perfiles diferentes, aunque esto puede indicar la existencia de especies crípticas (Hunt & Handoo, 2009).

En un trabajo desarrollado por Esbenshade y Triantaphyllou (1985), se destacó el uso de patrones de esterasa para diferenciar 16 especies de *Meloidogyne*, entre las que se destacaron fenotipos de *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla*. Por otro lado, en una investigación hecha

por Carneiro et al. (2001) se utilizaron cuatro enzimas distintas (esterasa, malato deshidrogenasa, superóxido dismutasa y glutamato oxaloacetato transaminasa) para realizar la caracterización de más de 100 poblaciones originarias de diferentes Estados de Brasil y países de América. Por lo tanto, fue posible determinar 34 fenómenos enzimáticos para diferentes especies de *Meloidogyne*, incluidos 18 fenotipos de esterasa, 6 de malato deshidrogenasa, 5 de superóxido dismutasa y 5 de glutamato oxaloacetato transaminasa.

Identificación molecular

La utilización de técnicas moleculares para diagnósticos de diferentes especies de fitopatógenos como los nematodos, ya sea por medio de análisis de ADN o análisis de proteínas se ha incrementado en los últimos años, garantizando así una mayor precisión en la identificación de las especies (Waele & Elsen, 2007). La identificación por medio del material genético es ventajosa debido a que no está influenciada por las condiciones ambientales o por el estadio de desarrollo del nematodo; es decir, la utilización de técnicas moleculares tiene un gran potencial en la identificación rutinaria de nematodos (Al-Banna et al., 2004).

Una de las primeras técnicas utilizadas en identificación molecular fue el uso de Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLPs), esta técnica es basada en el estudio de Polimorfismos generados mediante el uso de Enzimas de restricción como las endonucleasas que cortan el ADN en diferentes puntos, generando fragmentos que son separados posteriormente por medio de electroforesis (Becerra & Paredes, 2000), se ha utilizado esta técnica para diferenciar poblaciones de *M. arenaria* raza 2, cuando la identificación morfológica fue insuficiente, permitiendo diferenciar las poblaciones en muestras de hasta 30 nematodos (Carpenter et al. 1992), de la misma forma se ha utilizado de forma combinada con estudios de fenotipos de esterasas para identificación de *Meloidogyne* (Fargette et al. 1996). En la actualidad, los métodos moleculares basados en PCR para la identificación de las especies de *Meloidogyne*, incluyen el uso de regiones objetivas tales como: mtDNA (ADN mitocondrial) (Tigano et al., 2005; Powers et al., 2005), rDNA (ADN ribosómico) (Zijlstra et al. 1997; Saeki et al., 2002; Monteiro, 2016), región IGS (espaciador intergénico) (Wishart et al. 2002) y secuencias de los genes 18S, 5.8 y 28S del rDNA. Los métodos incluyen el uso de RFLP (Xu, et al., 2004), RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) (Tigano et al., 2010), sondas de microsátélites y ADN satélite, PCR multiplex (Saeki et al., 2002), iniciadores específicos SCAR (Zijlstra et al., 2000; Tigano et al., 2010; Jorge, 2016; Mattos, 2017) y PCR en tiempo real (Toyota et al. 2008; Agudelo et al., 2011; De Weerd et al., 2011; Sapkota et al., 2016).

Técnicas como PCR multiplex son muy útiles en la identificación de varias especies de forma conjunta, debido a que este tipo de procedimientos permiten

amplificar varios segmentos de ADN, en una sola reacción por medio del uso de dos o más sets de iniciadores (Bolívar et al. 2014), esta técnica ha sido ampliamente empleada para la identificación y detección de *M. incognita*, *M. enterolobii*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Hu et al. 2011; Devran et al. 2018; Wolf et al. 2013), usando ADN extraído de agallas provocadas por el nematodo en China y Turquía, así como en países del sudeste europeo, con la finalidad de desarrollar un método rápido de identificación. Este tipo de técnica ha sido utilizada en la identificación de *Meloidogyne* spp., y *Pratylenchus* spp., mediante el uso de iniciadores específicos, a partir de muestras de suelo donde existen la presencia de otros nematodos (Saeki et al. 2003).

La PCR convencional es un método de detección cualitativo, mientras que la PCR en Tiempo Real (Real Time PCR), se caracteriza en ser un método de detección pero que en forma simultánea cuantifica el producto amplificado por medio de la emisión de fluorescencia que es interpretada por un lector acoplado al termociclador (Cunha et al., 2018). Empleando esta técnica, De Weerd et al. (2010) desarrollaron un método para la identificación de *M. minor* a partir de ADN de un J2 en presencia de 10 poblaciones de seis especies de nematodos de las agallas. Así mismo Sapkota et al. (2016) identificaron *M. hapla* de raíces y suelo provenientes de un cultivo de zanahoria de campos infestados en Dinamarca. Otras especies tales como: *M. incognita*, *M. enterolobii*, *M. javanica*, *M. graminicola* han sido identificadas por medio de PCR en tiempo Real, ya sea solas o en muestras donde existe la presencia de otros nematodos fitopatógenos como *Globodera rostochiensis*, *Pratylenchus zae* y *Xiphinema elongatum* (Kiewnick, Frey & Braun-Kiewnick, 2015; Zhao et al., 2010; Toyota., 2008; Nguyễn et al., 2014; Berry et al., 2008).

Los métodos más recientes basados en PCR convencional usaron primers que son capaces de distinguir especies sin una etapa de digestión posterior (Kumar & Gurusubramanian, 2011), describieron la técnica RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) como una técnica utilizada para identificar la variación genética entre poblaciones de organismos por medio de la detección de polimorfismos; los marcadores moleculares RAPD se obtienen después de la amplificación por PCR de segmentos aleatorios del ADN, utilizando secuencias arbitrarias o no específicas de oligonucleótidos iniciadores. (Williamson et al., 1997. De la misma forma, Abd et al. (2019) sintetizaron y evaluaron primers de PCR derivados de las secuencias de RAPD en poblaciones de nematodos.

La técnica RAPD, fue utilizada años más tarde por Zijlstra et al. (2000), que usaron los marcadores específicos OPA-12420, OPB-061200, OPA-O1700, mediante el secuenciamiento de esas regiones genéticas, fueron identificados individuos de *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, a partir de muestras colectadas principalmente en regiones tropicales y

subtropicales. Por otro lado, en muestras colectadas en plantaciones bajo el sistema cultivo protegido, fueron analizadas muestras de ADN extraídas de masas de huevos, J2 y hembras, para la identificación precisa de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. mayaguensis*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* y *M. fallax* en combinación con marcadores de tipo Scar (Adam et al., 2007).

Los marcadores SCARs, son una de las herramientas moleculares más efectivas y precisas usadas para la identificación de microorganismos (Lee et al., 2013). Un SCAR es un fragmento de ADN genómico en un solo locus, genéticamente definido que es identificado por amplificación por PCR usando un par de iniciadores específicos, generalmente de 15 a 30 pares de bases (Paran & Michelmore, 1993). Los marcadores de SCAR presentan ventajas sobre los marcadores RAPD porque su amplificación por PCR es menos sensible a la condición de reacción (Paran & Michelmore, 1993; Bautista et al., 2002). Además, la amplificación por PCR de los SCARs es reproducible y puede ser fácilmente detectada. Por lo tanto, el análisis usando marcadores SCAR es simple, rápido y fácil de ejecutar (Yuakianti & Shiraishi, 2010).

Otra técnica empleada es AFLP, Fragmentos Polimórficos Amplificados al Azar, en esta técnica se basa en la amplificación por PCR de fragmentos que originados por enzimas de restricción, de esta forma se combinan los fundamentos de las técnicas RFLP y PCR, al igual que RAPD es de herencia dominante y ha sido utilizada ampliamente para caracterizar la diversidad genética de fitopatógenos (Becerra & Paredes, 2000; Mayer et al., 2010; Dos Santos et al. 2013; Casanovas et al. 2013; Rocha et al. 2015). como para analizar la diversidad genética de poblaciones de *M. chitwoodi* y *M. fallax*, donde se demostró la presencia de diversos grupos poblacionales de estos nematodos (Fargette et al., 2005), así mismo se ha utilizado esta técnica en combinación con marcadores RAPD, demostrando que la diversidad de poblaciones de *M. incognita* provenientes de cultivos de algodón en el estado de Bahía no se encuentra relacionada con la virulencia en relación a accesiones resistentes, lo que podría deberse a la presencia de 1 o 2 genes de resistencia en estos cultivares (Lopes et al., 2019)

Existen otras técnicas para la identificación molecular de *Meloidogyne* como la técnica LAMP (Amplificación isotérmica de ADN mediada por asas), que puede amplificar grandes cantidades de ADN con gran precisión, en un tiempo corto y además como es isotérmica puede realizarse a una sola temperatura estable, lo que resulta en que no necesita del uso del termociclador y los productos que derivan de la reacción pueden ser observados a simple vista en tubos de reacción, empleando colorantes de ligación al ADN (Mori & Notomi, 2009). Esta técnica ha sido empleada para amplificar segmentos genéticos como el espacio intergénico IGS2-18S, 5S, ITS del rDNA para la correcta y precisa identificación de *M. chitwoodi*, *M. enterolobii* y *M. hapla* (Niu et al., 2012; Peng et al., 2017).

Tabla 1Primers utilizados para la identificación de *Meloidogyne* spp. Adaptado de (Mao et al., 2019)

Especie	Primers	Secuencia de los primers 5' A 3'	(pb)	Referencia
<i>M. incognita</i>	Finc/ Rinc	GGGATGTGATAAATGCTCCTG CCCGCTACACCCTCAACTTC	399	Randig et al., 2002
<i>M. arenaria</i>	Fare/ Rare	TCGGCGATAGAGGTTAAATGAC TCGGCGATAGACACTACAAC	420	Zijlstra et al., 2000
<i>M. javanica</i>	Fjav/ Rjav	ACGCTAGAATTGACCCCTGG GGTACCAGAAGCAGCCATGC	517	Meng et al., 2004
<i>M. exigua</i>	Fexi/ Rexi	CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG CTCCGTGGGAAGAAAGACTG	562	Randig et al., 2002
<i>M. hapla</i>	Fhap/ Rhap	TGACGGCGGTGAGTGCGGA TGACGGCGGTACCTCATAG	610	Zijlstra, 2000

CONCLUSIONES

La identificación de las especies del nematodo fitoparásito *Meloidogyne* ha sido realizada principalmente mediante el uso de características morfológicas, sin embargo pueden existir ciertos inconvenientes en la identificación empleando únicamente este tipo de metodología, por tal motivo el empleo de técnicas más modernas como

el uso de marcadores moleculares basadas en estudio de ADN son empleadas de forma principal y rutinaria en la identificación de especies, debido a la alta precisión y confiabilidad en los resultados generados puede incluir de forma concisa, una posible investigación futura que se pueda realizar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd ElAzim, A., Khashaba, E. & Ibrahim, S. (2019). Correction to: Genetic polymorphism among seven entomopathogenic nematode species (Steinerematidae) revealed by RAPD and SRAP analyses. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29, Article number: 25.
- Adam, M., Phillips, M. & Blok, V. (2007). Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*, 56(1), 190-197.
- Agudelo, P., Lewis, S. & Fortnum, B. (2011). Validation of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification of *Meloidogyne arenaria*. *Plant Disease*, 95(7), 835-838.
- Akyazi, F. (2013). Molecular identification of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* from kiwi fruit orchards in Ordu province, Turkey 1 Ordu ili kivi bahçelerinde görülen kök-ur nematodu *Meloidogyne incognita*'nın moleküler teşhisi. *37(4)*, 449-456.
- Al-Banna, L. et al. (2004). Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology*, 36(2), 142-146.
- Álvarez-Ortega, S., Brito, J. & Subbotin, S. (2019). Multigene phylogeny of root-knot nematodes and molecular characterization of *Meloidogyne nataliei* Golden, Rose y Bird, 1981 (Nematoda: Tylenchida). *Sci Rep*, 9, 11788.
- Asmus G. L. (2001). Danos causados à cultura da soja por nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: Ferraz L. C. B. et al. Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginose da soja. Embrapa Soja. Londrina-PR.
- Bautista R., Crespillo R., Canovas F. & Claros M. (2002). Identification of olive tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica*, 129, 33-41.
- Becerra V. & Paredes M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, 60(3), 270-281.
- Berry, S. D., Fargette, M., Spuall, V. W., Morand, S. & Cadet, P. (2008). Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zeae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 22(3), 168-176.
- Blok, V. & Powers, T. (2009). Biochemical and Molecular Identification. In Perry, R.; Moens, M.; Starr, J. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International, 98-112.
- Bolívar, A., Rojas, A. & García-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 31(1), 25-33.
- Calderón-urrea, A., Vanholme, B., Vangestel, S., Kane, S., Bahaji, A., Pha, K. & Gheysen, G. (2016). Early development of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *BMC Developmental Biology*, 16, Art. 10.
- Carpenter, A., Hiatt, E., Lewis, S. & Abbott, A. (1992). Genomic RFLP Analysis of *Meloidogyne arenaria* Race 2 Populations. *Journal of Nematology*, 24(1), 23-238.
- Carneiro, R. & Almeida, M. (2001). Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, 25, 35-44.
- Carneiro, R., Tigano, M., Randig, O., Almeida, M. & Sarah, J. (2004). Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*, 6, 287-298.
- Carneiro, R., Randig, O., Almeida, M. & Gonçalves, W. (2005). Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR- Multiplex PCR.
- Carneiro, R. & Cofcewicz, E. (2008). Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza, R.M. Plant parasitic nematodes of coffee. Springer. Holand. p. 87-122.
- Casasnovas, F., Fantini, E. N., Palazzini, J. M., Gaj-Merlera, G., Chulze, S., Reynoso, M. & Torres, A. M. (2013). Development of amplified fragment length polymorphism (AFLP)-derived specific primer for the detection of *Fusarium solani* aetiological agent of peanut brown root rot. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6), 1782-1792.
- Cunha, T., Visôto, L., Lopes, E., Oliveira, C. & God, Ped. (2018). Diagnostic methods for identification of root-knot nematodes species from Brazil. *Ciência Rural*, 48(2), e20170449.
- Daramola, F., Popoola, J., Eni, A., & Sulaiman, O. (2015). Characterization of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) Associated with *Abelmoschus esculentus*, *Celosia argentea* and *Corchorus olitorius*. *Asian J. of Biological Sciences*, 8(1), 42-50.
- Dabur K., Taya A. & Bajaj HK. (2004). Life cycle of *Meloidogyne graminicola* on paddy and its host range studies. *Indian Journal of Nematology*. 34, 80-84.
- De Weerd, M., Kox, L., Waeyenberge, L., Viaene, N. & Zijlstra, C. (2011). A Realtime PCR Assay to identify *Meloidogyne minor*. *Journal of Phytopathology*, 159(2), 73-136.

- Devran, Z. Polat, I. Mistanoğlu, I. & Baysal, O. (2018). A novel multiplex PCR tool for simultaneous detection of three root-knot nematodes. *Australasian Plant Pathology*, 47(4), 389-392.
- Dos Santos Silva, A., De Oliveira, E. J., Haddad, F., De Jesus, O. N., De Oliveira, S. A. S., & Costa, M. A. P. de C. (2013). Molecular fingerprinting of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolates using AFLP markers. *Scientia Agricola*, 70(2), 108-115.
- Duarte, A., Maleita, C., Tiago, I., Curtis, R. & Abrantes, I. (2016). Molecular characterization of putative parasitism genes in the plant-parasitic nematode *Meloidogyne hispanica*. *Journal of Helminthology*, 90(1), 28-38.
- Duggal, P., Ram, S., Bhatia, A. & Patil, J. (2017). Life Cycle and Pathogenicity of *Meloidogyne incognita* on *Capsicum frutescens* under Poly-House as Compared to Screen-House Conditions. *Int. J. Pure App. Biosci.* 5(2): 1017-1024.
- Eisenback, J. & Hirschmann, H. (1981). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of head shape and stylet morphology. *Journal of Nematology* 13, 513-521.
- Eisenback, J. & Triantophyllu, H. (1991). Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. And races. In Nickle, WR. Eds. Manual of Agricultural Nematology. New York. USA. Marcel Dekker. 191-274.
- Eisenback, J. & Hunt, D. (2009). General morphology. In: Perry, RN.; Moens, N.; Starr, JI. (Eds). Root Knot Nematodes. Cambridge: CAB International Office. 18-54.
- Esemael, W., Aning, L., Iaene, N. & Oens, M. (2014). Life cycle and damage of the root-knot nematode *Meloidogyne minor* on potato, *Solanum tuberosum*. 16, 185-192.
- Fargette, M., Lollier, V., Phillips, M., Blok, V., & Frutos, R. (2005). AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. *Comptes Rendus - Biologies*, 328(5), 455-462.
- Fargette, M., Phillips, M., Blok, V., Waugh, R., & Trudgill, D. (1996). An RFLP study of relationships between species, populations and resistance-breaking lines of tropical species of *Meloidogyne*. *Fundamental and Applied Nematology*, 19(2), 193-200.
- Fernandez, L., Cabasan, M., & Waele, D. De. (2014). Archives of Phytopathology and Plant Protection Life cycle of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* at different temperatures under non-flooded and flooded conditions. 5408.
- Hartman, K. & Sasser, J. (1985). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal patterns morphology. In Barker, KR; Carter, CC; Sasser, JN. eds. An advanced treatise on Meloidogyne. v2. Methodology. Raleigh, USA, North Carolina State University Graphics. 69-77.
- Horrigue-raouani, H., Chitwood, T., & Chitwood, M. (2008). Biological Characteristics of Two Populations of *Meloidogyne* spp. Virulent to the Mi Resistance Gene in Tomato Isolated from South Tunisia.
- Hu, M., Zhuo, K. & Liao, J. (2011). Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology*, 101(11), 1270-1277.
- Hunt, D. & Handoo, Z. (2009). Taxonomy, identification and principal species. In Perry, R.; Moens, M; Starr, J. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. 55-88.
- Jones, J. T. et al. (2013). Top 10 plant parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, New Jersey, 14(9), 946-961.
- Jorge, A. (2016). Espécies de *Meloidogyne* em hortaliças e outras culturas provenientes de áreas periurbanas da África subsaariana. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília DF, Brasil.
- Karssen, G. & Moens, M. (2006). Root-knot nematodes. In Perry, RN; Moens, M. eds. Plant Nematology. London, UK. CAB International.
- Khan, T., Ashraf, M., & Hasan, S. (2006). Pathogenicity and life cycle of *Meloidogyne javanica* on balsam (*Impatiens balsamina*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(1), 45-48.
- Khan, T., Ashraf, M., & Dar, R. (2010). Pathogenicity and life cycle of *Meloidogyne javanica* on broccoli. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(6), 602-608.
- Kaur, H. & Attri, R. (2012). Morphological and Morphometrical Characterization of *Meloidogyne incognita* from Different Host Plants in Four Districts of Punjab, India. *Journal of Nematology*, 45(2), 122-127.
- Kiewnick, S., Frey, J. E., & Braun-Kiewnick, A. (2015). 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*, 105(9), 1245-1249.
- Kumar, N. & Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision*, 11(3), 116-124.
- Lambert, K. & Bekal, S. (2002). Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. *The Plant Health Instructor*. ID 87854345.
- Lee, D., Lee, S., Lee, S., & Lee, J. (2013). Development of SCAR markers for the identification of *Phytophthora katsurae* causing chestnut ink disease in Korea. *Mycobiology*, 41(2), 86-93.
- Lopes, C., Cares, J., Perina, F., Nascimento, G., Mendonça, J., Moita, A., Carneiro, R. (2019). Diversity of *Meloidogyne incognita* populations from cotton and aggressiveness to *Gossypium* spp. accessions. *Plant Pathology*, 68(4), 816-824.
- Mao, Y., Hu, Y., Li, C., Zhang, H., Yu, D., Liu, X., Yang, G., & Wang, C. (2019). Molecular identification of *Meloidogyne* species isolated from potato in China and evaluation of the response of potato genotypes to these isolates. *Nematology*, 21, 847-856.
- Magunacelaya, J. & Dagnino, E. (1999). Nematología agrícola en Chile. Chile. Serie Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas.
- Mattos, V. (2017). Caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* spp. do arroz, estabelecimento de marcadores SCAR e seleção de novas fontes de resistência em *Oryza* spp. a *M. graminicola*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília DF, Brasil.
- Mayer, L., da Silva, W., Moura, A., & Vendruscolo, C. (2010). AFLP analysis of *Xanthomonas axonopodis* and *X. arboricola* strains used in xanthan production studies reveal high levels of polymorphism. *Brazilian J of Microbiology*, 41(3), 741-748.
- Meng, Q., Long, H. & Xu, J. (2004). PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34, 204-210.
- Moens, M., Perry, R. & Starr, J. (2009). *Meloidogyne* species: a diverse group of novel and important plant parasites. In: Root-knot nematodes. Wallingford: CAB International.
- Monteiro, J. (2016). Caracterização morfológica, enzimática e molecular de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp.: identificação e sinonimização de espécies. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília DF, Brasil.
- Mori, Y. & Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 15(2) 62-69.
- Narasimhamurthy H., Ravindra H., Mukesh S., Rani N., Suresha D., Ekabote & Ganapathi. (2018). Biology and life cycle of rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*). *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 6(1), 477-479.
- Nguyên, P., Bellafiore, S., Petitot, A.-S., Haidar, R., Bak, A., Abed, A. & Fernandez, D. (2014). *Meloidogyne incognita*- rice *Oryza sativa* interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. *Rice*, 7(1), 23.
- Niu, J. H., Jian, H., Guo, Q. X., Chen, C. L., Wang, X. Y., Liu, Q. & Guo, Y. D. (2012). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology*, 61(4), 809-819.

- Oliveira, D., Oliveira, R., & Gonçalves, W. (2006). Fenótipo S1 de Esterase em *Meloidogyne incognita* no Brasil. *Fitopatol. Bras.*, 31(2), 4068.
- Oliveira C., Santos M. & Silva, L.H. (2016). Diagnóstico de Fitonematoides. Editorial Millenium. 1ra edición.
- Orion, D., Kritzman, G., Meyer, S., Erbe, E. & Chitwood, D. (2001). A role of the gelatinous matrix in the resistance of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp) eggs to microorganisms. *Journal of Nematology*, 33(4), 203.
- Paran, I., & Michelmore R. (1993). Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet*, 85, 985-993.
- Pathak K., Keshari N., & Haider M. (2000). Effect of population levels of *Meloidogyne incognita* on seed germination, seedling emergence and plant growth of Cauliflower. *Indian Journal of Nematology*, 30(1), 8-12.
- Peng, H., Long, H., Huang, W., Liu, J., Cui, J., & et al. (2017). Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology. *Scientific Reports*, 7, Article number: 44853.
- Perry, R., Moens, M. & Starr, J. (2010). Root-Knot Nematodes. Cabi. 488p.
- Petit, P. (1990). Reconocimiento de nematodos fitoparásitos asociados a frutales de importancia económica en Venezuela. *Fitopatol. Venez.*, 3(1), 2-5.
- Powers, T., Mullin, P., Harris, T., Sutton, L., & Higgins R. (2005). Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal of Nematology*, 37, 226-35.
- Randig, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R.M. & Castagnone-Sereno, P. (2002). Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*, 45, 862-870.
- Rocha, C., Vellicce, G., García, M., Pardo, E., Racedo, J., Perera, M., & Castagnaro, A. (2015). Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of *Phakopsora pachyrhizi*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 439-444.
- Rodríguez, M. (2000). Identificación y caracterización de *Meloidogyne mayaguensis* (Nemata: Meloidogynidae) en el café en Cuba. Tesis Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez. Cuba.
- Rusique, L., Inácio, M., Mota, M., & Nóbrega, F. (2018). Morphological, biochemical and molecular characterisation of *Meloidogyne javanica*, from North Portugal, in tomato. *Revista de Ciências Agrárias*, 41(1), 193-198.
- Saeki, Y., Kawano, J., Yamashita C., Akao, S., & Nagatomo, Y. (2013). Detection of plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus coffeae* by multiplex PCR using specific primers, *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(2), 291-295.
- Sapkota, R., Skantar, A., & Nicolaisen, M. (2015). A TaqMan real-time PCR assay for detection of *Meloidogyne hapla* in root galls and in soil. *Nematology*, 18, 147-154.
- Silva, M., Santos, C. & Silva, G. (2016). Espécies de *Meloidogyne* associadas a vegetais em microrregiões do estado do Ceará. *Ciência Agrônômica*, 47(4), 710-719.
- Steffen, R., Antonioli, Z., Kist, G., Lupatini, M. & Gomes. C.B. (2007). Caracterização bioquímica do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em lavouras de arroz irrigado na região central do Rio Grande do Sul. *Ciência e Natura, UFSM*, 29(1), 37 - 46.
- Tigano, M., Carneiro, R., Jeyaprakash, A., Dickson, D. & Adams, B. (2005). Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. *Nematology*, 7, 851-862.
- Tigano, M., Siqueira, K., Castagnone-Sereno, P., Mulet, K., & Queiroz, P. (2010). Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology*, 59, 1054-1061.
- Toyota, K., Shirakashi, T., Sato, E., Wada, S., & Min, Y. (2008). 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*, 54(1), 72-76.
- Trudgill, D., & Blok, V. (2001). Exceptionally Successful and Damaging Biotrophic Root Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 53-77.
- Waele, D., & Elsen, A. (2007). Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 457-85.
- Williamson, V., Caswell-Chen, E., Westerdahl, B., Wu, F. & Caryl, G. (1997). A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *J. Nematol.* 29, 9-15.
- Wishart, J., Phillips, M., & Blok, V. (2002). Ribosomal intergenic spacer: A polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology*, 92, 884-892.
- Wolf, S., Frey, J. E., Willareth, M., & Kiewnick, S. (2013). Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. *Nematology*, 15(7), 891-894.
- Xu, J., Liu, P., Meng, Q., & Long, H. (2004). Characterization of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 309-315.
- Ye, W., Zeng, Y., & Kerns, J. (2015). Molecular characterization and diagnosis of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from turfgrasses in North Carolina, USA. *PLOS ONE*, 10(11), 1-16.
- Yuakianti, V., & Shiraiishi, S. (2010). Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) Markers in Sengon (*Paraseriathes falcata* (L.) Nielsen. Hayati *Journal of Biosciences*, 17(4), 167-172.
- Zhao, Y., Ruan, W., Yu, L., Zhang, J., Fu, J., Shain, E., & Wang, J. (2010). Combining max Ratio analysis with real-time PCR and its potential application for the prediction of *Meloidogyne incognita* in field samples. *Journal of Nematology*, 42(2), 166-172.
- Zijlstra, C. (2000). Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: A powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 283-290.