

EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FITONEMATÓIDES

Edna Costa Manso & Renata Vilardi Tenente

*EMBRAPA-CENARGEN, SAIN, Parque Rural, Cx. Postal 02372
70770-000, Brasília, DF, Brasil*

RESUMO

Diversos parâmetros influenciam a extração dos fitonematóides e a seleção do melhor método a ser utilizado depende dos objetivos da extração. No presente trabalho, descrevem-se os princípios nos quais se fundamenta a grande maioria dos métodos utilizados.

A identificação de fitonematóides é comumente baseada nas características morfológicas da população. Entretanto, as características fisiológicas, citogenéticas, sorológicas e moleculares possibilitam aprofundar e estabelecer diferenças morfológicamente semelhantes entre taxons.

SUMMARY

EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF PLANT PARASITIC NEMATODES

Many factors can affect the efficiency of extracting plant-parasitic nematodes from both plant and soil samples. This chapter reviews the general principles on which most extraction methods are based on.

Whilst studies on nematode morphology form the basis for their identification, it is in the separation of closely-related species or races that methods such as physiology, cytogenetics, immunology, and molecular biology are being used in a more routine basis.

INTRODUÇÃO

A forma e o tamanho do corpo do nematóide, o tipo de parasitismo, o estágio de desenvolvimento, a mobilidade, o tipo de substrato em que

se encontra e as condições abióticas adversas às quais os nematóides estão submetidos são parâmetros que influenciam a extração dos fitonematóides.

Diversos são os tipos de métodos de extração de fitonematóides. Eles podem ser qualitativos ou quantitativos; podem ser utilizados para a extração de nematóides migratórios ou sedentários - nas formas vermiformes ou globosas, nos estádios ativos, de cistos ou de ovos - e para os nematóides presentes em solo ou em partes da planta hospedeira. Decidir qual método utilizar depende dos objetivos da extração.

Não convém, no presente trabalho, discorrer sobre todos os métodos existentes, já suficientemente detalhados em revisões como as de Hooper (1990), de Southey (1986) e de Tihohod (1993). O objetivo aqui é o de descrever os princípios nos quais se fundamenta a grande maioria dos métodos. Esse conhecimento conduzirá à seleção do caminho mais conveniente para o desenvolvimento de determinado trabalho.

A identificação de fitonematóides é mais comumente baseada nas características morfológicas da população. A observação e a mensuração de tais características, feitas anteriormente através do microscópio óptico, ganhou maior acuidade com o microscópio eletrônico de varredura e o de transmissão.

As características fisiológicas possibilitam a identificação de fitonematóides pelo grau de diferenciação de parasitismo em determinadas plantas. Testes com hospedeiros diferenciais são empregados para espécies morfológicamente muito semelhantes e para raças ou patótipos com diferentes hábitos alimentares.

Características citogenéticas, como o número de cromossomos, a morfologia do cariótipo, o mecanismo de determinação do sexo e o modo de reprodução, revelaram-se válidas na taxonomia e na sistemática dos fitonematóides. Essas características, entretanto, apesar de válidas como caracteres taxonômicos, têm aplicação limitada como caráter de identificação rotineira.

As características sorológicas são classicamente utilizadas na identificação de vírus e de fitobactérias, mas o mesmo não ocorre no caso dos fitonematóides, onde poucos são os estudos realizados. Anti-soros policlonais foram desenvolvidos para vários fitonematóides de importância econômica e, apesar da identificação de antígenos em algumas espécies, estes não foram específicos. Quando testados em outras espécies, resultam em várias reações cruzadas (El-Sherif & Mai, 1968; Hussey, 1979;

Schots et al., 1990). A especificidade foi obtida com o desenvolvimento de anti-soro monoclonal, secretado pela técnica de hibridoma (Schots et al., 1990). A aplicação de anti-soro monoclonal em teste de ELISA permitiu a diferenciação de espécies de *Meloidogyne* (Davis & Lander, 1992). Estes procedimentos, entretanto, são muito trabalhosos e precisam ser mais bem desenvolvidos para que possam ser aplicados na identificação rotineira de fitonematóides.

Atualmente, o uso de características moleculares começa a mostrar seu potencial na identificação de fitonematóides. Técnicas altamente sensíveis e específicas, que permitem a análise de proteínas e do material genético (DNA), têm sido empregadas principalmente na caracterização e na diferenciação de espécies morfológicamente semelhantes e de formas intrasubespecíficas, como raças e patótipos de importância econômica.

Todas as características, sejam elas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares, fazem parte do organismo e se complementam. A seleção de ferramentas apropriadas pode permitir a identificação precisa do taxon, mas, como declarou Heyns (1983), "é a natureza que cria as espécies; os taxonomistas não fazem mais que reconhecê-las, estudá-las, descrevê-las e, enfim, nomeá-las".

EXTRAÇÃO DE NEMATÓIDES

As populações de nematóides consistem de indivíduos móveis, ligeiramente móveis ou inativos (cistos, ovos individuais ou em massas), ou de combinações destes.

Os métodos de extração de fitonematóides utilizam, de preferência, a combinação de vários princípios. Nenhum método possui 100% de eficácia e as vantagens e desvantagens dependem das várias características do nematóide e do substrato em que ele se encontra. Alguns métodos são mais adequados para a extração de nematóides do solo, e outros, para partes de tecidos da planta. É raro aplicar-se apenas um método de extração. O ideal, normalmente, é a combinação de vários métodos.

PRINCÍPIOS GERAIS DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE NEMATÓIDES

FLUTUAÇÃO

A diferença entre o peso do nematóide e o da maioria das partículas de solo faz com que o nematóide, por ser mais leve, fique menos sujeito à ação da gravidade, permanecendo mais tempo em suspensão. Esse princípio, utilizado para a extração de nematóides em solo, é mais eficiente para os grupos de nematóides de tamanho pequeno. Pode ser aplicado tanto para as formas ativas como para as pouco ou não ativas, pois independe da mobilidade dos nematóides. Utilizando-se a sacarose, o sulfato de magnésio ou o sulfato de zinco, obtêm-se soluções mais densas que a água e os nematóides permanecem mais tempo em suspensão. Essas soluções aumentam a recuperação de nematóides, principalmente daqueles de maior tamanho e, portanto, mais pesados. O perigo é a forte pressão osmótica, em meio hipertônico, pois pode causar distorções nas estruturas ou a morte dos nematóides. É recomendável que o tempo de exposição dos nematóides a essas soluções seja o mais curto possível.

A flutuação é um dos princípios que compõem os métodos de peneiramento (Byrd et al., 1966), de centrifugação (Jenkins, 1964) e de elutriação (Hooper, 1990).

SEDIMENTAÇÃO

Os nematóides desprendidos das partículas de solo ou dos tecidos da planta são mais pesados (densidade= 1,09 a 1,10) que a água (densidade igual a 1), sedimentando após alguns minutos (3) pela ação da gravidade e permanecendo depositados. O método do Funil de Baermann e suas modificações baseiam-se neste princípio.

MACERAÇÃO

É o princípio aplicado à recuperação de nematóides de tecidos vegetais (raízes, folhas, caules e sementes), porque estes parasitos apresentam tendências de abandonar o tecido infestado e migrar para a água. Esta técnica, freqüentemente, é mais rápida na recuperação de nematói-

des e mais eficiente que alguns métodos já descritos, porque as partes do tecido vegetal são cortadas em pequenos pedaços e colocadas em água, facilitando a movimentação do nematóide e, portanto, diminuindo o tempo de permanência do tecido na água. Esta técnica pode utilizar período de extração superior a 48 horas, com a adição de enzimas ou de químicos que retardam a decomposição do material, obtendo, portanto, maior percentagem de recuperação desses parasitos.

FLOCULAÇÃO

Serve para extração de nematóides de raízes ou de solo. Durante o procedimento desta técnica são utilizados agentes floculantes, tais como Separan ou cloreto férrico ($FeCl_3$), que auxiliam na separação dos nematóides de partículas de solo ou de raízes floculantes. Geralmente, este método é usado em combinação com outros, tais como maceração, flutuação e peneiramento, mas deve-se salientar que esta técnica é o primeiro passo para a aplicação de outros métodos. Os agentes floculantes aumentam o peso das partículas de solo ou das partes de raízes e decanta-as rapidamente, permitindo que os nematóides fiquem na parte superior da suspensão. Embora esta técnica seja rápida e recupere diferentes gêneros de nematóides, servindo igualmente para clarificar as amostras, é possível que os floculantes possam agregar os nematóides de tamanho menor às partículas do substrato, dificultando sua extração.

MOBILIDADE OU MIGRAÇÃO

Método frequentemente utilizado para clarificar as suspensões de nematóides recuperadas de solo ou de partes da planta, usando o princípio da migração ativa, através de certos materiais, como papel de filtro, algodão ou tecido de papel (lenço, papel de cozinha etc). É necessário selecionar o material a ser utilizado para que se retenha maior quantidade de detritos e seja permitida a movimentação dos nematóides através dos poros. Nematóides com pouco movimento, ou que apresentam cutícula com apêndices ou ornamentações, ou ,ainda, formas sedentárias, não conseguem migrar através do filtro. Outra desvantagem é o risco de intoxicação através de componentes químicos do papel ou do algodão, que podem afetar o movimento dos nematóides.

Este princípio é aplicado nos métodos: funil de Baermann Tihohod (1993); vaporização de névoa de Seinhorst (1956); e técnica da bandeja (Whitehead e Hemming, 1965).

PRINCIPAIS MÉTODOS EM QUE OS PRINCÍPIOS DE EXTRAÇÃO SÃO APLICADOS

Como mencionado anteriormente, não serão detalhados os métodos de extração, mas da maneira pela qual os princípios atuam nestes métodos. Os passos para a execução dos métodos são descritos em revisões por Hooper, 1990; Zuckerman et al., 1985; Southey, 1986; e Tihohod, 1993.

Peneiramento - É muito usado para extração de nematóides de solo, além de servir para reduzir o volume das amostras obtidas de outros métodos. Consiste na utilização de peneiras sobrepostas com abertura máxima de 1/10 do comprimento do nematóide. Geralmente, a primeira peneira possui malha de 0,149mm (100 mesh), para reter os maiores detritos de solo, enquanto a segunda, com 0,037mm (400 mesh), retém os nematóides e as partículas menores de solo. Para extração de ovos de nematóides é utilizada a peneira de 0,044mm (500 mesh). Para aumentar a eficiência do método, o peneiramento da suspensão de solo deve ser repetido, pelo menos, 3 vezes.

Um dos inconvenientes deste método é o de se perder alguns indivíduos que ficam presos na malha da peneira. Sabe-se, entretanto, como demonstrou Mendes (1986), que nenhum método é igualmente eficiente para todos os gêneros de nematóides.

Centrifugação - é utilizada para extração de nematóides de solo e de raízes, sendo eficaz para os nematóides de pouca mobilidade, como os Criconematidoidea. É usado, ademais, para clarificar amostras obtidas pelo peneiramento ou pelo elutriador.

A flutuação é o princípio utilizado na segunda fase do método de centrifugação. Com o uso de soluções densas (Ex. açúcar 475g/litro), os nematóides tornam-se mais leves, permanecendo na parte superior da suspensão, e os detritos vegetais e as partículas de solo, mais pesados, decantam para o fundo do tubo.

Elutriação - é opção eficaz para extração de nematóides de solo. Os nematóides e as partículas mais leves de solo são mantidos em flutuação, através de fluxo constante de água, ao longo de uma coluna de vidro ou de metal. Uma vantagem deste método é a de que pode ser automatizado, e o fluxo de água, monitorado e ajustado para os diferentes tamanhos de nematóides.

Winfield et al. (1987) descreveram um novo elutriador de solo (Wye Washer), acreditando que as extrações por este método são melhores e de mais fácil operação que as de outras técnicas.

Funil de Baermann - trata-se de sistema simples, pouco dispendioso e de fácil execução. É usado na extração de nematóides dos tecidos de planta, de sementes, e de solo fino e serve, ainda, para clarear ou limpar amostras obtidas através de outros métodos.

A falta de oxigenação da água e a retenção de alguns nematóides no papel, ou nas paredes internas do funil, são algumas das desvantagens deste método. A falta de oxigenação pode ser letal aos nematóides ou causar uma ação nematostática, isto é, a paralisação dos indivíduos.

A eficiência do método original, demonstrada por Mendes (1986), indica a recuperação máxima de 30%, resultado que melhora em 20% com modificações do método.

As modificações a serem consideradas sobre o método do funil de Baermann são o acréscimo de H_2O_2 , ou de um oxigenador de ar ou a troca da água dos funis de 24 em 24 horas, aumentando a oxigenação da água, ou, ainda, a adição de antibióticos e/ou sulfato de estreptomicina à água do funil, evitando o crescimento de fungos e de bactérias que podem atacar os nematóides. Uma versão melhorada desta técnica do funil de Baermann envolve o uso de tabuleiros em vez de funis (Southey, 1986).

IDENTIFICAÇÃO

A identificação de uma população é o reconhecimento das características que a compõem e o seu agrupamento às espécies descritas. Nos casos em que a população apresenta características específicas que a distingue das demais, procede-se à identificação de um novo taxon. Assim, a população é descrita seguindo-se as normas estabelecidas internacionalmente, atribuindo-se o nome científico pelo qual será futuramente identificada.

O número crescente, nos últimos anos, de novos taxons de fitonematóides demonstra, entretanto, a existência aparente de uma "inflação taxonômica" (Luc et al., 1987). Dificuldades em se proceder à identificação levam, muitas vezes, à criação de um novo taxon. Em algumas diagnoses, um gênero novo é descrito como "C", por apresentar valores intermediários aos gêneros "A" e "B". A hipótese de a população "C" ser a ligação entre os outros dois gêneros não é analisada, quando poderia

ser a solução. Neste caso, ao invés de três gêneros, teríamos apenas um (Luc et al., 1987).

Diversas são as maneiras que permitem identificar os fitonematóides. Todas possuem vantagens e desvantagens e é isso que será tratado a seguir.

MORFOLÓGICA

A morfologia tem sido, até o presente, a base da taxonomia e da sistemática dos fitonematóides.

As características morfológicas são morfométricas e morfo-anatômicas.

As características morfométricas, ou seja mensuráveis, foram introduzidas na nematologia por De Man (1880) e ainda são citadas na literatura nematológica. São elas:

L: comprimento total do corpo, em mm

a: comprimento do corpo/maior largura do corpo

b: comprimento do corpo/distância da extremidade anterior do corpo à junção esôfago-intestino

c: comprimento do corpo/comprimento da cauda

c': comprimento da cauda/largura do corpo na altura da região anal ou da cloaca

V: distância da extremidade anterior do corpo à vulva x 100/comprimento do corpo

T: distância da cloaca à parte anterior do testículo x 100/comprimento do corpo

L estilete: comprimento do estilete, em μm

L espículo: comprimento do espículo, em μm

L gubernáculo: comprimento do gubernáculo, em μm

Outros parâmetros mensuráveis foram propostos por De Grisse (1964) e também incorporados às descrições de fitonematóides. São eles:

R: número total de anéis do corpo

R st: número de anéis entre o disco labial e a base do estilete

R oes: número de anéis entre o disco labial e a junção esôfago-intestino

R hem: número de anéis entre o disco labial e o primeiro anel após o hemizonídeo

R ex: número de anéis entre o disco labial e o primeiro anel após o poro excretor

R V: número de anéis da cauda à vulva (pode também indicar o número de anéis do disco labial à vulva - deve ser especificado na descrição)

R c: número de anéis da região posterior do corpo à região anal

R Van: número de anéis entre a vulva e a região anal

A validade taxonômica desses caracteres foi questionada por Geraert (1968), principalmente para os coeficientes a, b, c, V e T. Segundo Geraert, antes de o coeficiente ser usado, dever-se-ia analisar sua confiabilidade. Em seu trabalho, ele acredita que os coeficientes a e b não possuem valor taxonômico, pela extrema variabilidade que apresentam. Os coeficientes V e T são válidos nos casos em que o comprimento da cauda é independente do comprimento do corpo.

O estudo de significativas populações de *Hemicycliophora* e de *Caloosia*, por Costa-Manso (1990), permitiu avaliar a validade taxonômica dos caracteres morfométricos dessas espécies. Ficou demonstrado que L, V, R, L estilete, R ex e R V foram os caracteres mais estáveis, enquanto os mais variáveis foram R Va, R c e c'.

As características morfoanatômicas, não mensuráveis, descrevem a forma de partes do corpo ou a presença de estruturas específicas. Os caracteres citados na maioria das diagnoses são: forma da região labial, dos bulbos do estilete, do metacorpo, das glândulas esofagianas, da cardia, dos lábios vulvares ou espículos e da região pós-vulvar ou cauda.

O tipo de ornamentações cuticulares é outro caráter importante nas diagnoses, principalmente em determinados grupos, como a sub-família Criconematinae Taylor, 1936. Os representantes desse taxon são muito homogêneos internamente, sendo as ornamentações cuticulares umas das principais diferenças entre os gêneros e as espécies (Raski & Luc, 1987).

A identificação das espécies do gênero *Meloidogyne* também é complexa, devido à similaridade da grande maioria das características morfológicas. As diferenças nas linhas e nas formas da impressão perineal ainda são uma das formas rotineiramente usadas na classificação desse grupo ao microscópio óptico (Eisenback et al., 1981; Tihohod, 1993).

Os caracteres morfoanatômicos também devem ser utilizados com grande prudência, devido à grande variabilidade intra-específica a que estão sujeitos.

A variabilidade dos caracteres é a principal desvantagem da taxonomia morfológica. As primeiras descrições de fitonematóides não levaram em conta as variabilidades intra e inter-específica existentes. É comum observar descrições a partir de um único espécime, como as de Micoletzky (1913) e as de Thorne (1955). Atualmente, essa preocupação

tornou-se cada vez mais evidente nas descrições de Brzeski & Zuckerman, 1965; de Costa-Manso, 1990; e de Roca & Bravo, 1993.

A questão essencial é avaliar o intervalo confiável das variabilidades. A experiência do taxonomista e o uso de procedimentos estatísticos apropriados podem auxiliar na decisão (Fortuner, 1984). Para isso, é necessário que um número suficiente de indivíduos, pelo menos vinte, seja analisado. Mas, como nem sempre é possível, a diagnose deve basear-se em caracteres realmente fiáveis.

A utilização de caracteres mensuráveis de média, de extremos e de desvio padrão tem se tornado frequente nas diagnoses, favorecendo a análise das variabilidades (Barcina et al., 1992; Costa-Manso, 1990; Roca & Bravo, 1993).

A partir dos anos 70, a taxonomia morfológica ganhou forte aliado: o microscópio eletrônico de varredura (MEV). Muitos caracteres morfológicos localizados na superfície externa do corpo do nematóide, que anteriormente eram grosseiramente observados ou invisíveis ao microscópio óptico (MO), foram revelados pelos estudos ao MEV (Hischmann, 1983). A alta magnitude e a qualidade da resolução conseguida com o MEV clarificaram importantes estruturas da região labial - forma e tamanho das aberturas anfídiais, dos lábios laterais, do disco labial, e a presença de papilas cefálicas - e da região caudal - características sexuais secundárias do macho e detalhes da região perineal das fêmeas. Partes dissecadas do corpo, como estilete, espículo, espermatozóides, impressões perineais e superfícies de ovos e de cistos, visualizadas ao MEV, serviram para solucionar dificuldades taxonômicas na diferenciação de taxons (Eisenback, 1991).

A preparação do espécime é passo importantíssimo nas análises ao MEV. A má manipulação pode ocasionar a obscuridade de estruturas ou o aparecimento de artefatos que confundem a interpretação dos dados. A técnica de preparação do nematóide para observação ao MEV é detalhada por Eisenback (1991).

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) tem auxiliado o estudo filogenético de fitonematóides, através da descoberta de novas características morfológicas de valor taxonômico. A análise ao MET demonstrou que a ultra-estrutura da cutícula é variável em diversos grupos e é indicada como um caráter valioso na filogenia de taxons superiores (Baldwin & Powers, 1987). Em Tylenchida, a ultra-estrutura da espermatozoa e a morfologia do espermatozóide são aspectos promissores na diferenciação de taxons inferiores, incluindo espécies (Baldwin & Powers, 1987). A aplicabilidade do MET é irrefutável nos testes de hipóteses filogenéticas, entretanto o mesmo não ocorre na identificação de rotina. O MET é um instrumento que fortalece a sistemática dos fitonematóides, contribuindo para que a classificação e a identificação sejam construídas sobre firmes alicerces.

FISIOLÓGICA

A interação planta-hospedeiro pode servir como indicativo na identificação de espécies morfologicamente semelhantes e/ou de raças de fitonematóides, através do teste de hospedeiros diferenciais. Esse teste consiste na inoculação de populações puras, a serem identificadas em plantas que são hospedeiras específicas de determinados taxons.

Em nematologia, a planta é considerada hospedeira, se pelo menos, uma fêmea adulta produz ovos férteis, mas, nos testes de hospedeiros diferenciais, a reprodução é positiva quando, pelo menos, 10% das fêmeas adultas reproduzem (Powers, 1992).

A planta hospedeira pode ser resistente ou suscetível à infestação do nematóide. Segundo Riggs (1992), a intensidade da resistência ou da suscetibilidade está relacionada com o comportamento da planta e com a taxa de multiplicação do nematóide: resistente, se houver baixa taxa de multiplicação; suscetível, se a taxa de multiplicação for elevada.

O teste com hospedeiros diferenciais possui a vantagem de ser simples, uma vez obtidas as plantas indicadoras, e de baixo custo. Entretanto, demanda tempo para a obtenção dos resultados (pelo menos o período de um ciclo de vida do nematóide) e está sujeito às alterações fenotípicas e à criação de novas raças do parasito, pela alta pressão seletiva existente nos fitonematóides. Algumas raças apresentam segregação ou retrocruzamento e recombinação dos caracteres que controlam a preferência de hospedeiros. O retrocruzamento entre raças de *Ditylenchus dipsaci* originou progênes híbridas com patogenicidade diferente da dos tipos parentais.

Testes com hospedeiros diferenciais são comumente aplicados na determinação de espécies e/ou de raças economicamente importantes, como *Ditylenchus dipsaci* (Metlitzky, 1972, citado por Gubina, 1985), *Heterodera glycines* (Riggs & Schmitt, 1991) e *Meloidogyne* (Hartman & Sasser, 1985).

Ditylenchus dipsaci

No final do século XIX, Ritzema Bos (1892) constatou experimentalmente a presença de raças fisiológicas em *Ditylenchus dipsaci*. Até hoje, a complexa infectividade dessa espécie gera controvérsias quanto ao número de raças. Seinhorst (1957) reconheceu onze raças, enquanto Hesling (1966) definiu a existência de vinte e uma, que Metlitzky (1972), citado por Gubina (1985), reduziu para quinze (Tabela 1).

O teste de hospedeiros diferenciais proposto por Metlitzky (1972), citado por Gubina (1985), é uma evolução do teste formulado por Seinhorst (1957), onde as plantas de morango, de *Phlox* e de aveia são introduzidas, e a de trevo branco, retirada (Gubina, 1985) (Tabela 1).

Tabela 1. Teste de determinação de raças de *Diitylenchus dipsaci* em hospedeiros diferenciais, segundo Metlitzky, 1972 (Gubina, 1982)

Raça	Cardo	Trevo Vermelho	Alfafa	Ervilha	Batata	Narciso	Hiacinto	Tulipa	Morango	Phlox	Aveia
Cardo	+++	--	0	--	0	-	-	0	+++	0	+++
Trevo vermelho	0	+++	++	--	++	+	+	+	+++	0	+
Trevo branco	0	--	+	--	0	+	0	++	0	--	+
Alfafa	--	++	+++	+++	+	--	+	+++	0	--	+
Centeio	++	--	0	+++	+	--	--	--	0	++	+++
Aveia	++	++	+	+++	++	-	+++	+++	0	0	+++
Cebola	+	+	+	+++	+	++	--	--	+++	0	--
Batata I	--	--	-	+++	+++	0	0	--	+++	0	+++
Batata II	--	--	0	+++	+++	-	0	0	0	0	--
Hiacinto	0	0	0	0	0	+	+++	+	++	0	--
Narciso	--	++	+	0	+	+++	++	++	+++	--	++
Tulipa	0	++	++	0	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Beterraba	+	++	+++	+++	0	0	0	0	--	++	+++
Phlox	0	0	0	++	--	--	--	0	--	+++	--
Morango	--	++	++	+++	++	+	+	--	+++	--	--

Grau de infestação e multiplicação: (+++) infestação e multiplicação severas; (++) infestação e multiplicação moderadas; (+) infestação moderada, sem multiplicação; (-) infestação e multiplicação fracas; (-) infestação fraca, sem multiplicação; (0) sem infestação.

Heterodera glycines

A variabilidade fisiológica entre populações de *H. glycines* foi observada pela primeira vez por Ross (1962).

A diferenciação das raças de *H. glycines* baseia-se na reação dos cultivares resistentes selecionados: Pickett, Pecking, PI 88788 e PI 90763. O cultivar Lee, altamente suscetível, tem sido utilizado como testemunha positiva da infestação. Entretanto, alterações no comportamento do cultivar Lee foram observadas em testes realizados em 1991, onde Lee mostrou-se aparentemente resistente às raças 1 e 3. A partir desses resultados, há tendência de substituí-lo pelo cultivar Lee 74 (Riggs & Schmitt, 1991).

O resultado da infestação é considerado positivo (+) quando o número de fêmeas adultas é 10% maior, ou igual, que o número observado no cultivar testemunha (Lee), e negativo (-), se a taxa for 10% menor (Niblack, 1992).

Atualmente, dezesseis raças são reconhecidas e podem ser diferenciadas por testes de hospedeiros diferenciais (Riggs & Schmitt, 1988; Niblack, 1992) (Tabela 2).

Meloidogyne

O teste de hospedeiro diferencial, em conjugação com a morfologia, pode determinar as quatro principais espécies de *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla*) e as raças descritas para essas espécies (Hartman & Sasser, 1985) (Tabela 3).

A avaliação do teste é feita pela reação da planta à multiplicação do nematóide (resistente ou suscetível) e pela contagem do número de galhas e/ou de ootecas, proposta por Taylor & Sasser (1978), citado por Tihohod (1993) (Tabela 4).

Os procedimentos, que devem ser obedecidos, são detalhado por Tihohod (1993).

CITOGENÉTICA

Estudos da citogenética de nematóides foram iniciados no final do século passado, motivados pelo desejo de conhecer e explicar a função dos cromossomos na divisão celular, na reprodução e na hereditariedade (Triantaphyllou, 1983).

O número de cromossomos (n) é importante caráter citogenético utilizado na diferenciação de espécies de um mesmo gênero ou de gêneros de uma mesma família. O número de cromossomos já foi determinado para oitenta espécies de fitonematóides e esses estudos revelaram extensa diversidade citogenética entre os grupos analisados.

Tabela 2. Teste de diferenciação de raças de *Heterodera glycines*, baseado no índice de fêmeas (IF)*

Raça	Reação de cultivares de soja			
	Pickett	Peking	PI 88788	PI 90763
1	-	-	+	-
2	+	+	+	-
3	-	-	-	-
4	+	+	+	+
5	+	-	+	-
6	+	-	-	-
7	-	-	+	+
8	-	-	-	+
9	+	+	-	-
10	+	-	-	+
11	-	+	+	-
12	-	+	-	+
13	-	+	-	-
14	+	+	-	+
15	+	-	+	+
16	-	+	+	+

* IF = (nº de fêmeas adultas)/(nº de fêmeas adultas em Lee) x 100; (-) = IF 10 %; (+) IF 10 %. (Niblack, 1992).

Tabela 3. Resposta usual das quatro espécies mais comuns de *Meloidogyne* e de suas raças ao teste diferencial da Carolina do Norte (Hartman & Sasser, 1985)

Espécies de <i>Meloidogyne</i> e raça fisiológica	Planta hospedeiro diferencial					
	Algodão	Fumo	Pimentão	Melancia	Amendoim	Tomate
<i>M. incognita</i>						
Raça 1	-	-	+	+	-	+
Raça 2	-	+	+	+	-	+
Raça 3	+	-	+	+	-	+
Raça 4	+	+	+	+	-	+
<i>M. arenaria</i>						
Raça 1	-	+	+	+	+	+
Raça 2	-	+	-	-	-	+
<i>M. javanica</i>						
	+	+	-	+	-	+
<i>M. hapla</i>						
	-	+	+	-	+	+

Cultivares das plantas hospedeiras: algodão = Deltapine 61; fumo = NC 95; pimentão = Early California Wonder; melancia = Charleston gray; amendoim = Florunner; tomate = Rutgers; (-) resistente; (+) suscetível.

Tabela 4. Escala para avaliação da reação da planta hospedeira e da multiplicação de *Meloidogyne*, segundo Taylot & Sasser (1978) (Tihohod, 1993)

Grau	Reação	Multiplicação (Número de galhas e/ou ootecas)
0	Resistente	0
1	Resistente	1-2
2	Resistente	3-10
3	Suscetível	11-30
4	Suscetível	31-100
5	Suscetível	>100

O menor número de cromossomos, cinco, foi observado entre as famílias Pratylenchidae e Hoplolaimidae, embora existam espécies com $n = 6, 7, 8$ ou 10. A família Anguinidae apresentou variação entre as espécies de *Anguina*, com $n = 9, 18$ ou 27, e em *Ditylenchus*, com $n = 12$ ou 24. A extensão da variabilidade citogenética em um mesmo gênero pode ser bem ilustrada entre as espécies de *Meloidogyne*. As características citogenéticas de 23 espécies de *Meloidogyne* são descritas por Eisenback & Triantaphyllou (1991), demonstrando que o número de cromossomos nas espécies haplóides varia de 7 a 34, e nas diplóides, de 30 a 56. Hackney (1974) utilizou o número de cromossomos na identificação das espécies *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. hapla*.

As características citogenéticas, embora altamente válidas nos estudos taxonômicos, não são aplicáveis nas identificações de rotina.

SOROLÓGICA

Desde 1964, técnicas sorológicas estão sendo estudadas na diferenciação taxonômica de fitonematóides. Esses trabalhos, relacionados por Schots et al. (1990), englobam as espécies *Aphelenchus avenae*, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Ditylenchus dipsaci*, *D. destructor*, *D. myceliophagus*, *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Heterodera betulae*, *H. carotae*, *H. cruciferae*, *H. glycines*, *H. goettingiana*, *H. schachtii*, *H. trifolii*, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*.

Anti-soros policlonais são obtidos com a injeção de nematóides inteiros ou fraccionados, em coelhos. Entretanto, o anti-soro policlonal reconhece amplo espectro de substâncias antígenas, todas presentes em vários taxons, como espécies de um mesmo gênero ou de gêneros de uma mesma família, tornando-o não específico (Williamson, 1991).

A detecção por anti-soro policlonal pode facilitar os testes de rotina quando se deseja detectar apenas a presença de representantes de determinadas famílias ou de gêneros. A vantagem é que os parasitos podem ser detectados mesmo misturados a solo ou tecido vegetal, além de serem testes rápidos, simples e relativamente pouco dispendiosos.

A especificidade pode ser obtida com o uso de anti-soro monoclonal. Na preparação desse tipo de anti-soro usa-se a fusão de células imunizadas e secretadoras de anticorpos em ratos, com células linfáticas tumorais, resultando em células híbridas, denominadas hibridomas. O hibridoma, que pode ser cultivado in vivo e em grande escala, é a célula que secreta o anticorpo monoclonal (Williamson, 1991; Schots et al., 1990).

Em nematologia, foram aplicados fundamentalmente os testes de imunodifusão e de ELISA.

Na imunodifusão, a interação anticorpo - antígeno (extrato do nematóide e a solução adjuvante) produz bandas de imunoprecipitação, que são observadas em placas de ágar. A imunodifusão foi utilizada por El-Sherif & Mai (1968), sem obter resultados específicos, na identificação de *Aphelenchus avenae*, de *Panagrellus redivivus* e de *Diplogaster sp.*

O teste de ELISA consiste em colocar o antígeno em contato com anti-soro em um suporte sólido (placa de polietileno ou membrana). A essa reação é adicionado um segundo anti-soro, ao qual está ligado uma enzima, capaz de ser reconhecida com a adição do substrato da enzima. Esse reconhecimento produz uma reação colorida na proporção da quantidade do antígeno presente (Williamson, 1991).

O teste de ELISA foi efetuado usando-se anti-soros policlonal e monoclonal na diferenciação das espécies *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* (Davies & Lander, 1992). O anti-soro policlonal revelou a presença de muitos antígenos conservados nas três espécies, tornando difícil a diferenciação. Entretanto, três anti-soros monoclonais selecionados foram capazes de identificar as respectivas espécies (Davies & Lander, 1992).

A produção de anti-soro monoclonal, para os nematóides do cisto de batata, também permitiu a diferenciação das duas principais espécies, *Globodera rostochiensis* e *G. pallida* (Schots et al., 1989). O resultado do uso do anti-soro monoclonal demonstrou ser possível o seu uso em testes rotineiros de identificação dessas espécies. É necessário, no entanto, vencer dificuldades na homogeneização dos nematóides, bem como conhecer os efeitos dos resíduos de material orgânico nos cistos e a interação dos fumigantes de solo com esses antígenos (Schots et al., 1989).

MOLECULAR

A identificação molecular de fitonematóides, com a análise do material genético, tornou-se possível com a aplicação de técnicas de proteínas e de DNA. Metodologias desenvolvidas para outros organismos foram adaptadas para gêneros e para espécies de fitonematóides economicamente importantes.

Proteína

As proteínas são sintetizadas a partir das informações genéticas contidas no DNA e não estão sujeitas às variações ambientais e físicas. Estudos comparativos entre populações de uma mesma espécie, originá-

rias de diversas localidades e de diferentes hospedeiros, comprovaram a estabilidade do padrão protéico (Dickson et al., 1991; Pais & Abrantes, 1989).

A técnica de eletroforese de proteínas em gel de poliácridamida tornou evidente a diferenciação entre espécies dos gêneros *Anguina*, *Aphelenchus*, *Bursaphelenchus*, *Ditylenchus*, *Globodera*, *Heterodera*, *Radopholus* e *Meloidogyne* (Curran, 1991; Williamson, 1991).

O padrão protéico pode ser determinado pela extração de proteínas específicas ou de proteína total. A complexidade da análise de proteína total dificulta a interpretação dos resultados e torna-a suscetível a erros; com isso, o padrão de proteínas específicas é mais empregado nos estudos taxonômicos. Dentre elas, as mais comumente estudadas são: a esterase, a malato desidrogenase, a glucose fosfatase (Dickson et al., 1971; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Williamson, 1991). A esterase e a malato desidrogenase são utilizadas na diferenciação das principais espécies de *Meloidogyne*: *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica*, *M. chitwoodi*, *M. naasi*, *M. exigua* e *M. graminicola* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Dalmasso & Bergé, 1983).

As vantagens da identificação por eletroforese de proteínas são a eficiência do método em diferenciar espécies, a rapidez e o baixo custo. Entretanto, têm as desvantagens de não ser suficientemente sensível para a diferenciação de raças e de ter que utilizar espécime do mesmo estágio de desenvolvimento nos testes comparativos - a atividade da enzima é normalmente mais baixa nos estádios juvenis e nas fêmeas maduras e trabalha com poliácridamida, substância tóxica utilizada na preparação dos géis de eletroforese, que deve ser manuseada com precaução.

DNA

A identificação de espécies e de raças de fitonematóides, através da análise do DNA, começou nos anos 80, com a técnica do DNA recombinante. Essa técnica possibilitou a análise direta de 100 % das sequências de nucleotídeos do genoma. A análise protéica exclui 75-80% das sequências do genoma, não envolvidas na codificação de proteínas. Essas sequências possuem elevado grau de polimorfismo e não são influenciadas por aspectos ambientais e fenotípicos e nem pelo estágio de desenvolvimento do nematóide (Curran, 1991).

Duas propriedades são fundamentais em biologia molecular: 1) a capacidade de as enzimas de restrição reconhecerem e clivarem pares de bases específicas do DNA, produzindo fragmentos de restrição de tamanhos polimórficos (RFLP); 2) a habilidade de desnaturação das fitas duplas de DNA e, posteriormente, de hibridização com sequências complementares (Castagnone-Sereno, 1992). Com base nessas propriedades, foram desenvolvidas as técnicas de RFLP, de hibridização com sondas homólogas e heterólogas, de PCR e de RAPD. As metodologias das técnicas moleculares são descritas, passo a passo na revisão de Batista (1993). Atualmente, essas técnicas são utilizadas na diferenciação de espécies e de raças dos gêneros *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Xiphinema*, *Ditylenchus* e *Bursaphelenchus* (Curran, 1991; Caswell-Chen et al., 1992).

A técnica de RFLP mostrou-se altamente sensível na identificação de fitonematóides. A análise do genótipo, por RFLP, evidenciou polimorfismos no genoma, capazes de diferenciar quatro espécies de *Meloidogyne* e suas raças (Curran et al., 1986), e patótipos de *Bursaphelenchus xylophilus* (Bolla et al., 1988). O agrupamento de dezesseis populações de *Xiphinema americanum* em cinco categorias foi proposto por Vrain et al. (1992), após a análise por RFLP.

A caracterização e a diferenciação de populações de *M. incognita* foram obtidas com a digestão do DNA total, e a hibridização, com sondas homólogas radioativas (Castagnone-Sereno, 1991). A construção de sondas radioativas possibilitaram a identificação de *Ditylenchus dipsaci* - raça da aveia (Palmer et al., 1991) e das raças de *Heterodera glycines* (Besal et al., 1988).

Embora as sondas sejam extremamente sensíveis, o seu uso envolve a desvantagem da radioatividade. Isótopos radioativos de fósforo ^{32}P são utilizados como marcadores. Além do perigo que representa para a saúde, o custo elevado e a dificuldade em adquiri-lo limitam sua utilização. Sondas com marcador não radioativo, como a biotina, estão sendo desenvolvidas. Burrows (1990) demonstra o uso efetivo de sondas não radioativas na detecção da presença de *Globodera pallida*. Essa perspectiva aumentará a aplicabilidade do uso de sondas.

As técnicas de PCR e de RAPD possuem, sobre a de RFLP, a vantagem de se trabalhar com quantidades muito pequenas de DNA inicial, extraída de reduzido número de indivíduos.

A técnica de PCR foi aplicada a dezessete populações de *Meloidogyne incognita*, de *M. hapla*, de *M. javanica* e de *M. arenaria*. Foram amplificadas sequências específicas do DNA mitocondrial, extraídas de

espécime único. A avaliação do produto amplificado indicou sítios de restrição polimórficos específicos para cada espécie (Harris et al., 1990).

A limitação da técnica de PCR é a exigência de se conhecer previamente a seqüência do genoma a ser amplificada, para que se definam os "primers" das reações. Essa limitação favoreceu a técnica de RAPD, que utiliza "primers" arbitrários, sem considerar a seqüência do DNA, que se deseja amplificar. Através dessa técnica é possível o diagnóstico precoce de *Heterodera crucifera* e de *H. schachtii*, a partir de um único cisto (Caswell-Chen et al., 1992).

LITERATURA CITADA

- BALDWIN, J.G. & POWERS, T.O. 1987. Use of fine structure and nucleic acid analysis in systematics. In: Veech, J.A. & Dickson, D.W. (Ed.). Vistas on Nematology. Hyattsville, MD, Society of Nematologists. p:336-45.
- BARCINA, A.G.; GERAERT, E.; CASTILLO, P. & PAIS, M.A.G. 1992. Three *Malenchus* species from Spain (Nemata: Tylenchidae) with a note on the amphidial opening in the genus. Fundam. Appl. Nematol. 15:153-7.
- BATISTA, M.F. 1993. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. In: Luz, W.C. da; Fernandes, J.M.; Prestes, A.M. & Picinini, E.C. (Ed.). Rev. An. Patol. Plant. p.165-96.
- BESAL, E.A.; POWERS, T.O.; RADICE, A.D. & SANDALL, L.J. 1988. A DNA hybridization probe for detection of soybean cyst nematode. Phytopathology 78:1136-39.
- BOLLA, R.I.; WEAVER, C. & WINTER, R.E.K. 1988. Genomic differences among pathotypes of *Bursaphelenchus xylophilus*. J. Nematol. 18:83-6.
- BRZESKI, M. & ZUCKERMAN, B.M. 1965. Morphological variations, life stages and emended description of *Hemicycliophora zuckermani* Brzeski, 1963 (Nematoda, Criconematidae). Nematologica 11:66-72.

- BURROWS, P.R. 1990. The rapid and sensitive detection of the plant parasitic nematode *Globodera pallida* using a non-radioactive biotinylated DNA probe. *Revue Nématol.* 13:185-90.
- BYRD, D.W., NUSBAUM, C.J. & BARKER, K.R. 1966. A rapid flotation-sieving technique for extraction nematodes from soil. *Pl. Dis. Rep.* 50:954-7.
- CASTAGNONE-SERENO, P. 1992. Evolution of molecular biology techniques in nematode nuclear DNA characterization: results and prospects for identification and phylogeny. XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Lavras, Soc. Bras. Nematol., p.8-9.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; PIOTTE, C.; ABAD, P.; BONGIOVANNI, M. & DALMASSO, A. 1991. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among *Meloidogyne incognita* populations. *J. Nematol.* 23:316-20.
- CASWELL-CHEN, E.P.; WILLIAMSON, V.M. & WU, F.F. 1992. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Heterodera cruciferae* and *H. schachtii* populations. *J. Nematol.* 24:343-51.
- COSTA-MANSO, E. 1990. Contribution à l'étude de représentants de la sous-famille des Hemicycliophorinae (Nematoda: Tylenchida). Gent, Belgique, Instituut voor Dierkunde. Tese de Doutorado.
- CURRAN, J. 1991. Application of DNA analysis to nematode taxonomy. In: Nickle, W.R. (Ed.). *Manual of agricultural nematology*. New York, Marcel Dekker Inc, p. 125-43.
- CURRAN, J. 1992. Molecular taxonomy of nematodes. In: Gommers, F.J. & Maas, P.W.Th. (Ed.). *Nematology from molecule to ecosystem*. Envergrowie, Dundee, Scotland, European Society of Nematologists, p. 83-91.
- CURRAN, J.; MC CLURE, M.A. & WEBSTER, J.M. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. *J. Nematol.* 18: 83-6.
- DALMASSO, A. & BERGÉ, J.B. 1983. Enzyme polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne*. In: Stone, A.R.,

- Platt, H.M. & Khalil, L.F. (Ed.). Concepts in nematode systematics. New York, Academic Press, p.187-96.
- DAVIES, K.G. & LANDER, E.B. 1992. Immunological differentiation of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp) using monoclonal and polyclonal antibodies. *Nematologica* 38:353-66.
- De GRISSE, A. 1964. Morphological observations on *Criconemoides*, with a description of four new species found in Belgium (Nematoda). *Meded. LandbHogesch. OpzoekStns Gent* 29:734-61.
- De MAN, J.K. 1880. Die Einheimischen, frei in der reinen Erde unde im süßen wasser lebenden Nematoden. Vorläufiger Bericht und descriptiv systematischer Theil. *Tijdschr. ned dierk. Vereen* 5:1-104.
- DICKSON, D.W., HUISINGH, D. & SASSER, J.N. 1971. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. *J. Nematol.* 3:1-16.
- EISENBACK, J.D. 1991. Methods for collection and preparation of nematodes - Part 2. Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. In: Nickle, W.R. (Ed.). *Manual of agricultural nematology*. New York, Marcel Dekker Inc., p.87-96.
- EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J.N. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) - with a pictorial key. Raleigh, North Carolina, International *Meloidogyne* Project.
- EISENBACK, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: Nickle, W.R. (Ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. New York, Marcel Dekker Inc., p.191-274.
- EL-SHERIF, M. & MAI, W.F. 1968. The use of immunodiffusion in the nematode identification. *Nematologica* 14:593-5.
- ESBEWSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *J. Nematol.* 17:6-20.

- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 22:10-5.
- FORTUNER, R. 1984. Statistics in taxonomic descriptions. *Nematologica* 30: 187-92.
- GERAERT, E. 1968. Morphometric relations in nematodes. *Nematologica* 14:171-83.
- GUBINA, V.G. 1985. Biological races; caryotypes and hybridization of *Ditylenchus* (Ladygika, N.M.) In: Gubina, V.G. (Ed.). Plants and soils: genus *Ditylenchus*. Karachi, Paquistão, OICR,ARS, p.101-20.
- HACKNEY, R.W. 1974. The use of chromosome number to identify *Meloidogyne* spp. on grapes. *J. Nematol.* 6:141-2.
- HARRIS, T.S., SANDALL, L.J. & POWERS, T.O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *J. Nematol.* 22:518-24.
- HARTMAN, K.M. & SASSER, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: Barke, K.R.; Carter, C.C. & Sasser, J.N. (Ed.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Raleigh, North Carolina State Univ. Graphics, v.2, p.69-77.
- HESLING, J.J. 1966. Biological races of stem eelworms. Rep. Glas-house Crops Res. Inst. for 1965. p.132-41.
- HEYNS, J. 1983. Problems of species delimitation in the genus *Xiphinema*, with special references to monosexual species. In: Stone, A.R., Platt, H.M. & Khalil, L.F. (Ed.). Concepts in nematode systematics. London, Academic Press, p. 163-74.
- HIRSCHMANN, H. 1983. Scanning electron microscopy as a tool in nematode taxonomy. In: Stone, A.R., Platt, H.M. & Khalil, L.F. (Ed.). Concepts in nematode systematics. London, Academic Press, p.96-111.
- HOOPER, D.J. 1990. Extraction and processing of plant and soil nematodes. In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (Ed.). Plant parasitic

- nematodes in subtropical and tropical agriculture. U.K., C.A.B. International Institute of Parasitology, p.45-68.
- HUSSEY, R.S. 1979. Biochemical systematics of nematodes. Review. Helminth. Abstr. (Ser.B) 48:141-8.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Dis. Rept. 48:692.
- LUC, M.; MAGGENTI, A.R.; FORTUNER, R.; RASKI, D.J. & GERART, E. 1987. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 1. For a new approach to the taxonomy of Tylenchina. Rev. Nématol. 10:127-34.
- MENDES, M. de L. 1986. Análise comparativa de alguns métodos de extração de nematóides do solo. Viçosa, UFV. Tese de Mestrado.
- MICOLETZKY, H. 1913. Die freilebenden Süßwassernematoden der Ost-Alpen. 1. Teil der vorläufige Mitteilung: Die freilebenden Süßwassernematoden des Lunzer Seegebietes. Math-Naturw. Kl., Abt1, 122:111-2.
- NIBLACK, T.L. 1992. The race concept. In: Riggs, R.D. & Wrather, J.A. (Ed.). Biology and management of the soybean cyst nematode. St. Paul, MN, APS Press, p.73-86.
- PAIS, C.S. & ABRANTES, L.M.O. 1989. Esterase and malate dehydrogenase phenotypes in portuguese populations of *Meloidogyne* species. J. Nematol. 21:342-6.
- PALMER, H.M., ATKINSON, H.J. & PERRY, R.N. 1991. The use of DNA probes to identify *Ditylenchus dipsaci*. Rev. Nématol. 14:625-8.
- POWERS, T.O. 1992. Nematode race identification, a look to the future. In: Riggs, R.D. & Wrather, J.A. (Ed.). Biology and management of the soybean cyst nematode. St. Paul, MN, APS Press, p.107-14.
- RASKI, D.J. & LUC, M. 1987. The reappraisal of Tylenchina (Nemata) 10. The superfamily Criconematoidea Taylor,1936. Rev. Nématol. 10:409-44.

- RIGGS, R.D. 1992. Host range. In: Riggs, R.D. & Wrather, J.A. (Ed.) *Biology and management of the soybean cyst nematode*. St. Paul, MN, APS Press, p.107-14.
- RIGGS, R.D. & SCHMITT, D.P. 1988. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. *J. Nematol.* 20:392-5.
- RIGGS, R.D. & SCHMITT, D.P. 1991. Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure. *J. Nematol.* 23:149-54.
- RITZEMA BOS, J. 1892. L'anguillule de la tige (*Tylenchus devastatrix* Kuhn), et les maladies des plantes due a ce nematode. *Arch. Musee Teeyley* 23:161-348.
- ROCA, F. & BRAVO, M.A. 1993. The occurrence of *Xiphinema sphaerocephalum* Lamberti et al. and *X. hispanum* Lamberti et al. (Nematoda: Longidoridae) in Portugal with description of *X. lanceolatum* sp.n. and *X. lapidosum* sp.n.. *Fundam. Appl. Nematol.* 16:455-65.
- ROSS, J.P. 1962. Physiological strains of *Heterodera glycines*. *Plant Dis. Rep.* 46:766-9.
- SCHOTS, A.; GOMMERS, F.J.; BAKKER, J. & EGBERTS, E. 1990. Serological differentiation of plant-parasitic nematode species with polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Nematol.* 22:16-23.
- SCHOTS, A.; HERMSEN, T.; SCHOUTEN, S. & EGBERTS, E. 1989. Serological differentiation of potato-cyst nematode *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*. II. Preparation and characterization of specific monoclonal antibodies. *Hybridoma* 8:401-13.
- SEINHORST, J.W. 1956. Populations studies on stem eelworms (*Ditylenchus dipsaci*). *Nematologica* 1:159-164.
- SEINHORST, J.W. 1957. Some aspects of the biology and ecology of stem eelworms. *Nematologica* 2:335-61.
- SOUTHEY, J.F. 1986. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, HMSO.

- THORNE, G. 1955. Fifteen new species of the genus *Hemicycliophora* with an emended description of *H. typica* de Man (Tylenchida: Criconeematidae). Proc. Helminth. Soc. Wash. 22:1-16.
- TIHOHOD, D. 1993. Nematologia agrícola aplicada. Jaboticabal, FUNEP.
- TRIANANTPHYLLOU, A.C. 1983. Cystogenetic aspects of nematode evolution. In: Stone, A.R., Platt, H.M. & Khalil, L.F. (Ed.). Concepts in nematode systematics. London, Academic Press. p: 55-72.
- VRAIN, T.C., WAKARCHUK, D.A., LÉUESQUE, A.C. e HAMILTON, R.I. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment lenght polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. Fundam. Appl. Nemat. 15:563-74.
- WHITEHEAD, A.G. & HEMMING, J.R. 1965. A comparasion of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Ann. Appl. Biol., 55:25-38.
- WILLIAMSON, V.M. 1991. Technical methods for collection and preparation of nematodes. Part 4. Molecular techniques for nematode species identification In: Nickle, W.R. (Ed.). Manual of agricultural nematology. New York. Marcel Dekker, Inc. p:107-24.
- WINFIELD, A.L., ENFIELD, M.A. & FOREMAN, J.H. 1987. A column elutriator for extracting cyst nematodes and other small invertebrates from soil samples. Ann. Appl. Biol. 111:223-31.
- ZUCKERMAN, B.M.; MAI, W.F. & HARRISON, M.B. 1985. Plant nematology-laboratory manual. Amherst, MA, The University of Massachusetts Agricultural Experiment Station.