

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida pela candidata Cibele Marli Cação Paiva Gouvea e aprovada pela Comissão Julgadora.

UNICAMP, 30 de julho de 1990

MANUTENÇÃO DE CULTURAS MONOXÊNICAS DE

Avelino Rodrigues de Oliveira

Pratylenchus zeae, Pratylenchus penetrans e

Pratylenchus brachyurus

CIBELE MARLI CAÇÃO PAIVA GOUVEA

Orientador: Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia, Área Bioquímica.

CAMPINAS - SP

1990

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A JÚLIO, JULIANA, CAMILA,

VALTER, ZÉLIA e

VALTINHO,

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Valter e Zélia, os grandes responsáveis pela minha formação.

A Júlio, Juliana e Camila razão do meu trabalho.

Ao Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, exemplo de pesquisador, pela orientação desde o primeiro ano de universidade, pela excepcional contribuição em minha formação profissional, amizade e apoio.

A Dra. Marinez Muraro Alves de Lima pela iniciação na Nematologia orientação e amizade.

Ao Dr. Darcy Martins da Silva pela orientação, amizade e valiosas contribuições.

Ao Biólogo José Luis Donatto pelo auxílio no preparo dos antissoros.

A Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas pelo fornecimento das culturas de nematóides.

A Universidade Estadual de Campinas e a CAPES pela oportunidade da realização do curso e pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que contribuíram com minha formação profissional e que, de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

## ABREVIATURAS

2,4D - ácido 2,4 diclorofenoxiacético

2-ME - 2 - mercaptoetanol

d - dalton

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiaminotetriaacético

PM - peso molecular

SDS - dodecil sulfato de sódio

Tris - trihidroxi metil amino metano

TEMED - N, N, N', N' tetrametil etileno diamina

## ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	7
3.1 Obtenção de inóculo de <u>Pratylenchus</u> spp.....	7
3.1.1 Origem das culturas assépticas de <u>Praty-</u> <u>lenchus</u> .....	7
3.1.2 Manutenção e aumento das culturas assép- ticas de <u>Pratylenchus</u> .....	7
3.2 Extração de <u>Pratylenchus</u> das culturas assépti- cas .....	9
3.3 Extração de proteínas totais de macerado de es- pécies de <u>Pratylenchus</u> .....	10
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamidadodecil sul- fato de sódio .....	10
3.5 Testes de dupla difusão em ágar .....	12
3.6 Extração de DNA total de espécies de <u>Pratylen-</u> <u>chus</u> .....	15
3.7 Eletroforese em gel de agarose .....	16

	página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
4.1 Manutenção e aumento das culturas assépticas de espécies de <u>Pratylenchus</u> .....	18
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS de proteínas totais de espécies de <u>Pratylenchus</u> ..	26
4.3 Testes de dupla difusão em ágar de macerado total de espécies de <u>Pratylenchus</u> .....	28
4.4 Eletroforese em gel de agarose de DNA total de macerado de espécies de <u>Pratylenchus</u> .....	29
5. CONCLUSÕES .....	34
6. BIBLIOGRAFIA .....	36

## RESUMO

Foram mantidas e aumentadas culturas monoxênicas de Pratylenchus zaeae, P. penetrans e P. brachyurus.

A influência de dois meios de cultura sobre a reprodução dos nematóides em calos de alfafa foi estudada. O meio simplificado de RIEDEL et alii propiciou reprodução para P. zaeae, P. penetrans e P. brachyurus comparável à do meio tradicional de MURASHIGE e SKOOG, de composição mais complexa.

Proteínas totais de macerado de nematóides mantidos em cultura foram extraídas e submetidas a análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS revelado um padrão com bandas de PM de 55.000, 26.000, 16.000 e 14.0000 d características para P. zaeae; com PM de 50.000 e de 36.000 e 19.000 para P. penetrans e com PM de 39.000, 34.000 e 23.000 d para P. brachyurus.

Foram realizados testes de dupla difusão em ágar com antissoros obtidos a partir de macerado total de nematóides, tendo sido obtidas reações cruzadas entre os antígenos e antissoros homólogos e heterólogos.

A análise eletroforética em gel de agarose de DNA total extraído de macerado de nematóides revelou um perfil com ban-

das específicas para P. penetrans com PM de 19,16; 1,41; 0,62 e 0,09 x 10<sup>6</sup> d; para P. zeae com PM de 0,07 x 10<sup>6</sup> d e para P. brachyurus com PM 0,08 x 10<sup>6</sup> d.



## ABSTRACT

Monoxenic cultures of Pratylenchus zaeae, P. penetrans and P. brachyurus have been maintained and increased.

The influence of two culture media on the nematode reproduction has been studied. RIEDEL et alii simplified medium made possible nematode reproduction comparable to the MURASHIGE and SKOOG, which has a more complex composition.

Total proteins of nematodes macerate kept in culture have been extracted and submitted to the electrophoretic analysis in SDS-poliacrylamide gel. The electrophoretic pattern revealed the following bands: MW of 55,000; 26,000; 16,000 and 14,000 d characteristical for P. zaeae; MW of 50,000 and 36,000 and 19,000 d for P. penetrans and MW of 39,000; 34,000 and 23,000 d for P. brachyurus.

Agar double diffusion tests have been made with antiserum obtained from total nematode macerates. The tests presented cross reactions among those species.

Samples of total nematode macerate's DNA have been analyzed by agarose gel electrophoresis, which revealed a profile of specific bands, as follow: P. penetrans with MW of

19.16; 1.41; 0.62 and  $0.09 \times 10^6$  d; P. zeae with MW of  $0.07 \times 10^6$  d; and P. brachyurus with MW of  $0.08 \times 10^6$  d.

## 1. INTRODUÇÃO

Nematóides do gênero Pratylenchus são considerados, primariamente, parasitas do córtex das raízes, migrando inter e intracelularmente no parênquima e causando áreas necróticas na superfície radicular, visíveis como diminutas lesões. Além do dano causado às raízes, é observado na planta infectada uma redução no crescimento da planta, como um todo, característica da ação dos nematóides, sugerindo algum outro efeito sobre as plantas do que o esperado de simples dano mecânico.

Esse gênero foi descrito em 1880 e atualmente são conhecidas mais de vinte espécies de Pratylenchus. São chamados "nematóides das lesões das raízes" e têm sido identificados causando prejuízos consideráveis em várias culturas de interesse econômico. A maioria das espécies de Pratylenchus é extremamente polífaga atacando ampla gama de plantas hospedeiras. No Brasil constituem um grupo de fitopatógenos muito importante, pois são encontrados parasitando culturas economicamente importantes.

A nomenclatura e taxonomia de nematóides parasitas de plantas continua passando por mudanças devido, principalmente, a características morfológicas semelhantes, que criam dificuldades na separação de espécies e raças. Métodos auxiliares da taxonomia morfológica são a análise de proteínas, eletroforese de DNA,

sequenciamento de proteínas, sequenciamento de DNA e serologia.

A obtenção de nematóides fitoparasitas livres de contaminantes para utilização de métodos bioquímicos é um ponto importante a ser considerado. As técnicas de cultura de nematóides fitoparasitas em tecidos de calos vegetais podem fornecer altas populações de nematóides biologicamente puros.

O presente trabalho teve como objetivos obter inóculo de espécies de Pratylenchus em cultura asséptica e testar a possibilidade de separação das espécies por eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida-SDS e por eletroforese de DNA total em gel de agarose a partir de macerado total de Pratylenchus.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A primeira espécie constatada no Brasil foi Pratylenchus brachyurus (LORDELLO et alii, 1968). Mais tarde outras espécies foram assinaladas como P. zaeae, P. vulnus, P. coffeae, P. penetrans, porém, é certa a existência de outras espécies em solos brasileiros (LORDELLO, 1986).

Devido à dificuldade de manutenção de inóculo de nematóides endoparasitas migradores em casa-de-vegetação, a cultura asséptica representa a alternativa mais viável para obtenção de inóculo. As técnicas de culturas de nematóides fitoparasitas em tecidos vegetais são muito importantes pelo fato de constituírem um sistema experimental simples, de condições físicas e químicas controladas para investigação de vários aspectos da interação patógeno-hospedeiro. Como os nematóides parasitas obrigatórios de plantas não se multiplicam na ausência de células vivas, esse sistema propicia um meio de manutenção e suprimento de inóculo livre de contaminantes (CASTRO, 1986). Pratylenchus é o gênero que apresenta maior número de espécies propagadas em culturas assépticas.

MOUNTAIN (1955) foi o primeiro a descrever métodos para a cultura contínua de nematóides sob condições estéreis, mas foi o trabalho de KRUSBERG (1961) que proporcionou o primeiro im-

pulso significativo na cultura asséptica de alguns nematóides fitoparasitas migratórios. Desde, então, uma ampla gama de estudos fisiológicos, bioquímicos e patogênicos têm sido conduzidos sendo utilizadas culturas assépticas. Alguns outros autores relataram métodos para manutenção e propagação de culturas assépticas de espécies de Pratylenchus (ZUCKERMAN, 1971; KRUSBERG, 1979; LIMA, 1982; RIEDEL et alii, 1983; CASTRO, 1986).

As técnicas bioquímicas podem auxiliar na taxonomia morfológica e filogenia de nematóides, especialmente quando os caracteres morfológicos entre espécies são semelhantes ou quando ocorrem diferenças em formas raras. Os métodos bioquímicos mais utilizados são comparação de isoenzimas, comparação de proteínas por imunologia e eletroforese, hibridação e eletroforese de DNA (HANSEN e BUECHER, 1970; HUSSEY, 1979).

Eletroforese em gel de poliacrilamida, particularmente poliacrilamida-SDS, tem sido uma técnica importante na separação e caracterização de proteínas solúveis, especialmente por sua capacidade de separação por peso molecular, sendo capaz de separar proteínas de homogeneizados crus (SVASTI e PANJPAN, 1977; HUSSEY, 1979). A aplicação e teoria de eletroforese em gel de poliacrilamida, bem como possíveis modificações têm sido descritas em muitos artigos e livros (DAVIS, 1964; ORNEISTEIN, 1964; GORDON, 1970; SVASTI e PANJPAN, 1977; HAMES e RICKWOOD, 1981).

Os primeiros a utilizarem eletroforese para estudos de proteínas não enzimáticas e enzimáticas de espécies de nematóides fitoparasitas e microbívoros foram BENTON e MYERS (1966). Outros autores utilizando eletroforese em gel conseguiram obter padrões proteicos diferentes para várias espécies de gêneros de nematóides fitoparasitas como Meloidogyne (DICKSON, et alii, 1970; 1971; HUSSEY et alii, 1972; BERGÉ e DALMASSO, 1975; DALMASSO e BERGÉ, 1978; FARGETTE, 1987, 1 e 2; VEECH et alii, 1987); Ditylenchus (DICKSON et alii, 1970); Radopholus (HUETEL et alii, 1983); Heterodera e Globodera (TRUDGILL e CARPENTER, 1971; TRUDGILL e PARROT, 1972; GREET e FIRTH, 1977; FRANCO, 1979; BAKKER et alii, 1988).

Técnicas de serologia podem oferecer oportunidade para identificação de fitopatógenos em larga escala. As vantagens dessas técnicas são especificidade, rapidez e simplicidade, podendo ser utilizadas rotineiramente. As reações antígeno-anticorpo são primariamente estudadas por difusão em gel ou por imunoletroforese (HUSSEY, 1979).

Em 1964, BIRD demonstrou que a injeção de suspensão de nematóides do gênero Meloidogyne induziu a formação de anticorpos em coelhos. LEE (1965) fez a identificação de duas espécies de Meloidogyne por imunodifusão. Estudos com este gênero demonstraram que várias espécies são serologicamente relacionadas (HUSSEY, 1971; 1972; McCLURE et alii, 1973; MISAGHI e McCLU-

RE, 1974; BARON, 1975). Grupos serológicos distintos foram identificados ainda, entre diferentes espécies de Heterodera (WEBSTER e HOOPER, 1968; SCOTT e RIGGS, 1971; RIGGS et alii, 1982) e Ditylenchus (WEBSTER e HOOPER, 1968; GIBBINS e GRANDISON, 1968).

A eletroforese em gel tem sido útil na separação e caracterização de macromoléculas. A utilização de eletroforese em gel de agarose tem sido útil em estudos de DNA, principalmente devido sua capacidade de separação de DNA em função do peso molecular (HELLING et alii, 1974). A utilização desta técnica em nematologia é relativamente recente. DNA total, genômico e mitocondrial têm sido extraídos de espécies de nematóides fitoparasitas e diferenças têm sido observadas. A análise de DNA tem sido utilizada para estabelecer divergências genéticas de populações. O gênero Meloidogyne tem sido o mais estudado, com estabelecimento de diferenças entre espécies e raças (CURRAN et alii, 1985; CURRAN et alii, 1986; GEORGI et alii, 1986; POWERS et alii, 1986; PABLEO et alii, 1988; POWERS e SANDALL, 1988). Outros gêneros como Heterodera (RADICE et alii, 1988; KALINSKI e HUETEL, 1988) e Bursaphelenchus (BOLLA et alii, 1988) têm sido estudados.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de inóculo de *Pratylenchus* spp

##### 3.1.1 Origem das culturas assépticas de *Pratylenchus* spp

Culturas assépticas de três espécies de *Pratylenchus* em calos de alfafa (*Medicago sativa*L.) cv. Crioula foram obtidas a partir do banco de nematóides da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. Foram obtidas culturas assépticas de *Pratylenchus zeae* GRAHAM, 1951; *Pratylenchus penetrans* (COBB, 1917) CHITWOOD e OITEFA, 1952 e *Pratylenchus brachyurus* (GOODFREY, 1929) FILIPJEV e SCHURMANS STEKHOVEN, 1941.

##### 3.1.2 Manutenção e aumento das culturas assépticas de *Pratylenchus* spp

As culturas assépticas de espécies de *Pratylenchus* foram repicadas a cada três meses, segundo LIMA (1982), a partir da obtenção de calos de raízes de alfafa.

Sementes de alfafa foram submetidas a tratamento térmico prévio a 63°C por 30 min. e a seguir tratadas com hipoclorito de sódio 5% durante 30 min. Outro tratamento utilizado pa-

ra sementes foi solução de hipoclorito de sódio 5% (v/v) contendo formalina 5% (v/v) e SDS 1% (p/v) durante 30 min. e a seguir lavadas com água destilada estéril. Uma vez esterilizadas superficialmente, as sementes de alfafa foram inoculadas em meio de RIEDEL et alii (1973), sem 2,4D, em placas de petri. Após incubação por 7 dias em sala escura foram selecionadas plântulas livres de contaminantes e transferidas para frascos contendo meio de RIEDEL et alii. Decorridos 7 dias algumas plântulas infectadas com Pratylenchus das culturas assépticas antigas (aproximadamente 3 meses) foram transferidas para os frascos contendo calos de raízes de alfafa.

Foi testada a influência dos meios de cultura de RIEDEL et alii (1973) e de MURASHIGE e SKOOG (1962) sobre a reprodução de Pratylenchus e sobre o desenvolvimento de calos de alfafa. Os nematóides foram inoculados a partir de plântulas infectadas de culturas antigas e noventa dias após a inoculação foi determinado o peso do calo fresco e o número de nematóides por frasco de cultura. O calo de alfafa foi transferido para bêquer contendo 10ml de água e seu peso determinado em balança analítica. Posteriormente o calo e a água de pesagem foram utilizados para extração de nematóides.

### 3.2 Extração de *Pratylenchus* das culturas assépticas

A extração de espécies de *Pratylenchus* de culturas assépticas foi feita primeiramente pelo método de funil de Baermann modificado, tendo sido substituído pelo método de COOLEN e D'HERDE (1972).

Plântulas de alfafa infectadas com nematóides foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1cm e homogeneizadas em Omnimixer Sorvall em intensidade mínima por 30 seg. A seguir a suspensão foi passada em peneiras de 60 e 400 mesh (250 e 38  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Os nematóides retirados da peneira de 400 mesh juntamente com restos de plântulas de alfafa e meio de cultura foram transferidos para tubo de centrifuga e adicionados 1  $\text{cm}^3$  de caolim. A solução foi centrifugada a 1.750g por 5 min. O sobrenadante ( $S_1$ ) foi descartado e ao precipitado ( $P_1$ ) foi adicionado solução de sacarose 454 g/l (gravidade específica 1,18 ou 38,5% p/v), homogeneizado e centrifugado a 1.750g por 1 min. (COOLEN e D'HERDE, 1972). O sobrenadante ( $S_2$ ) contendo nematóides foi coletado e centrifugado a 15.000g por 2 min. e utilizados para extração de proteínas e DNA totais de macerado (ESQUEMA 1).

### 3.3 Extração de proteínas totais de espécies de *Pratylenchus*

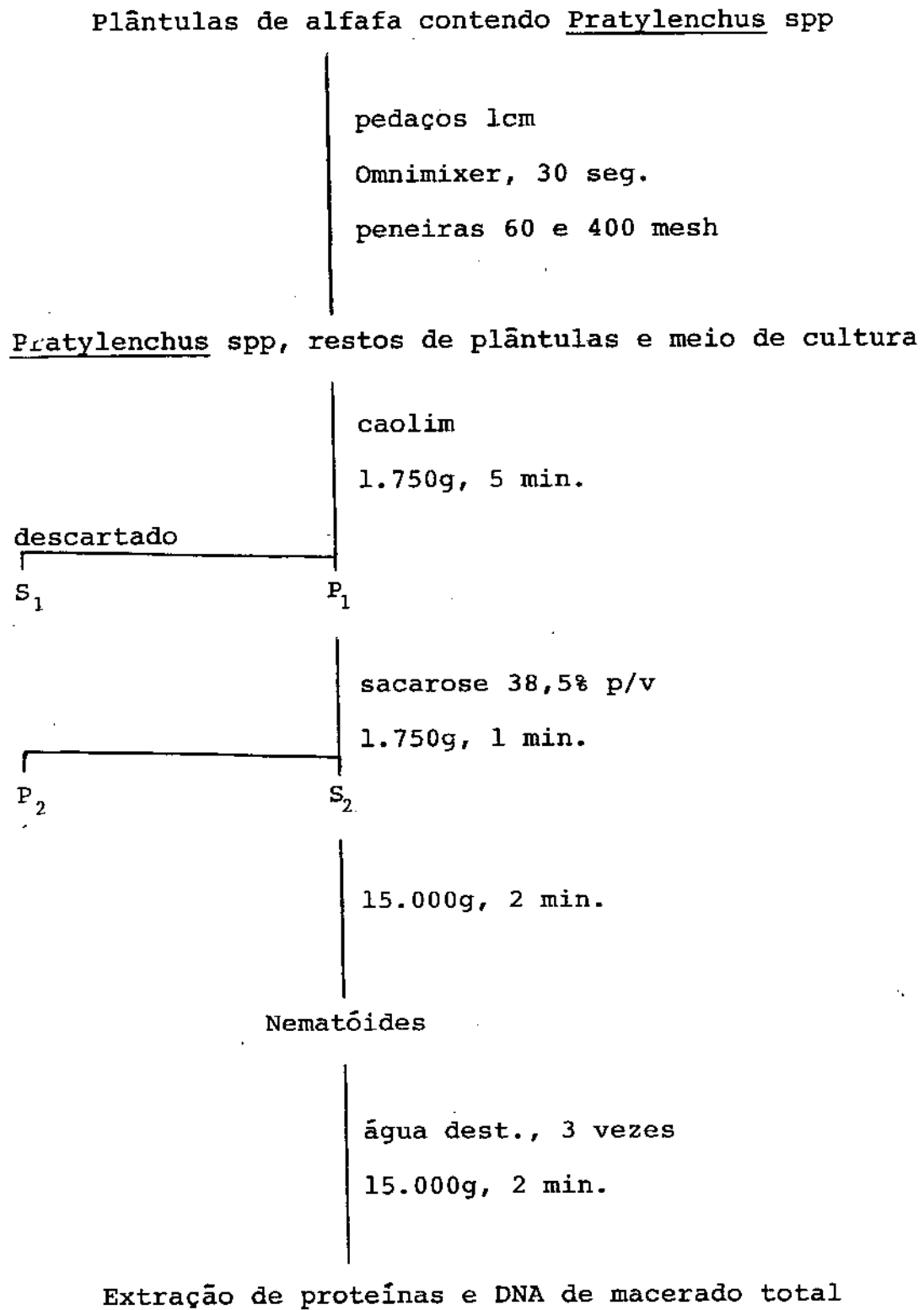
Para fins de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foram extraídas proteínas totais a partir de macerado de nematóides extraídos de culturas assépticas. Os nematóides (cerca de 2.000) foram macerados em homogeneizador de teflon com tampão Tris-HCl 0,001 M, pH 7,4 a 4°C contendo 2-mercaptoetanol (2-ME) 5% (v/v). Ao homogeneizado foi adicionado igual volume de tampão Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8 contendo SDS 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e glicerol 10% (v/v) (tampão da amostra). A seguir a preparação foi aquecida em banho-maria a 100°C por 10 min. e centrifugada a 15.000g por 2 min. O sobrenadante foi utilizado para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e armazenado (-18°C), o precipitado foi descartado.

### 3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

Amostras de proteínas totais de macerado de espécies de *Pratylenchus* extraídos de culturas assépticas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em sistema descontínuo-desnaturante, segundo HAMES e RICKWOOD (1981).

O sistema foi constituído por dois géis com concentrações diferentes de poliacrilamida, o gel de resolução contendo 12% de acrilamida e medindo 10cm de comprimento e o gel de empa-

ESQUEMA 1. Extração de Pratylenchus spp de culturas assépticas



cotamento contendo 3,5% de acrilamida e medindo 1,5cm de comprimento (TABELA 1). As amostras de proteína foram dosadas pelo método de BRADFORD (1976), aplicadas no gel e a eletroforese conduzida em placa vertical a 8v e 4mA durante 16h em tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3 contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (p/v). Após a corrida eletroforética o gel foi conduzido por prata e analisado pelo método de BLUM et alii (1987; TABELA 2). O peso molecular das proteínas separadas pela eletroforese foi estimado através da utilização de um padrão de peso molecular contendo sorboalbumina bovina (PM 66.000), albumina de ovo (PM 45.000), pepsina (PM 34.700), tripsinogênio (PM 24.000), lactoglobulina (PM 18.400) e lisozima (PM 14.300).

### 3.5 Testes de dupla difusão em ágar

Espécies de Pratylenchus extraídas de culturas assépticas foram utilizadas para imunizar coelhos com peso aproximado de 2kg, através de injeção via linfonóculo, segundo OLIVEIRA (1975). Antes da primeira injeção os animais foram sangrados para controle (soro normal).

Os antissoros foram obtidos através de sangrias periódicas na veia marginal da orelha e utilizados para testes de dupla difusão em ágar contra macerado total de espécies de Pratylenchus. Os testes foram feitos em lâminas de microscopia em

TABELA 1. Soluções estoque e quantidades utilizadas para o preparo de gel de poliacrilamida-SDS.

SOL. ESTOQUE	GEL EMPAC. 3,5%(ml)	GEL RESOLUÇÃO (ml)		
		16%	12%	10%
Acrl:Bis (30:0,8)	1,170	16,000	12,000	10,000
Tris 1M pH 6,8	1,170			
Tris 1M pH 8,8		11,250	11,250	11,250
H <sub>2</sub> O dest.	7,530	2,600	6,700	8,700
20% (p/v)SDS	0,050	0,150	0,150	0,150
TEMED	0,005	0,015	0,015	0,015
10%(p/v) persulfato de amônio	1,500	4,500	4,500	4,500

TABELA 2. Fases e reagentes utilizados na coloração por prata descrita por BLUM et alii (1987).

ETAPA	SOLUÇÕES	TEMPO
01. Fixação	metanol 50%, ác. acético 12%, 0,5ml HCOH 37%/1	60 min.
02. Lavagem	etanol 50%	3x20 min.
03. Pré-trat.	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (0,2g/1)	1 min.
04. Lavagem	H <sub>2</sub> O	3x20 seg.
05. Impreg.	AgNO <sub>3</sub> (2g/1) 0,75ml HCOH 37%/1	20 min.
06. Lavagem	H <sub>2</sub> O	2x20 seg.
07. Desenvolv.	Na <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> (60g/1) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5 H <sub>2</sub> O (4mg/1) 0,5ml HCOH 37%/1	20 min.
08. Lavagem	H <sub>2</sub> O	2x2 min.
09. Interrup.	metanol 50% ác. acético 12%	10 min.
10. Lavagem	metanol 50%	20 min.



gel de ágar 1,5% (p/v). A leitura foi feita após 48h e a seguir as lâminas foram lavadas e coradas por negro de amido 0,1%.

### 3.6 Extração de DNA total de espécies de *Pratylenchus*

DNA total de espécies de *Pratylenchus* obtidos de culturas assépticas foi extraído segundo MANIATIS *et alii* (1982). Os nematóides foram macerados em homogeneizador de teflon com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,8 contendo EDTA 0,001 M (tampão TE pH 7,8), a 4°C. Ao homogeneizado foi adicionado solução estoque de fenol, contendo 50ml de fenol, 48ml de clorofórmio, 2ml de álcool isoamílico e 0,05% de ditiotretitol ou 2-mercaptoltanol e após 5 minutos a amostra foi centrifugada a 3.500g por 10 min., o precipitado (P<sub>1</sub>) foi tratado novamente com clorofórmio. O precipitado (P<sub>2</sub>) foi descartado e o sobrenadante (S<sub>2</sub>) foi tratado com Ribonuclease (RNase - A) por 30 min. a 10 µl/ml de solução. Decorrido o tempo foi adicionado igual volume de clorofórmio e após 5 min. a amostra foi centrifugada a 3.500g por 10 min. O precipitado (P<sub>3</sub>) foi descartado e ao sobrenadante (S<sub>3</sub>) foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e a preparação mantida a -20°C por 12h. Decorrido o tempo a preparação foi centrifugada a 2.800g por 10 min.

O ácido nucleico obtido foi utilizado para eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), após dosagem a 260 a 280 nm (ESQUEMA 2).

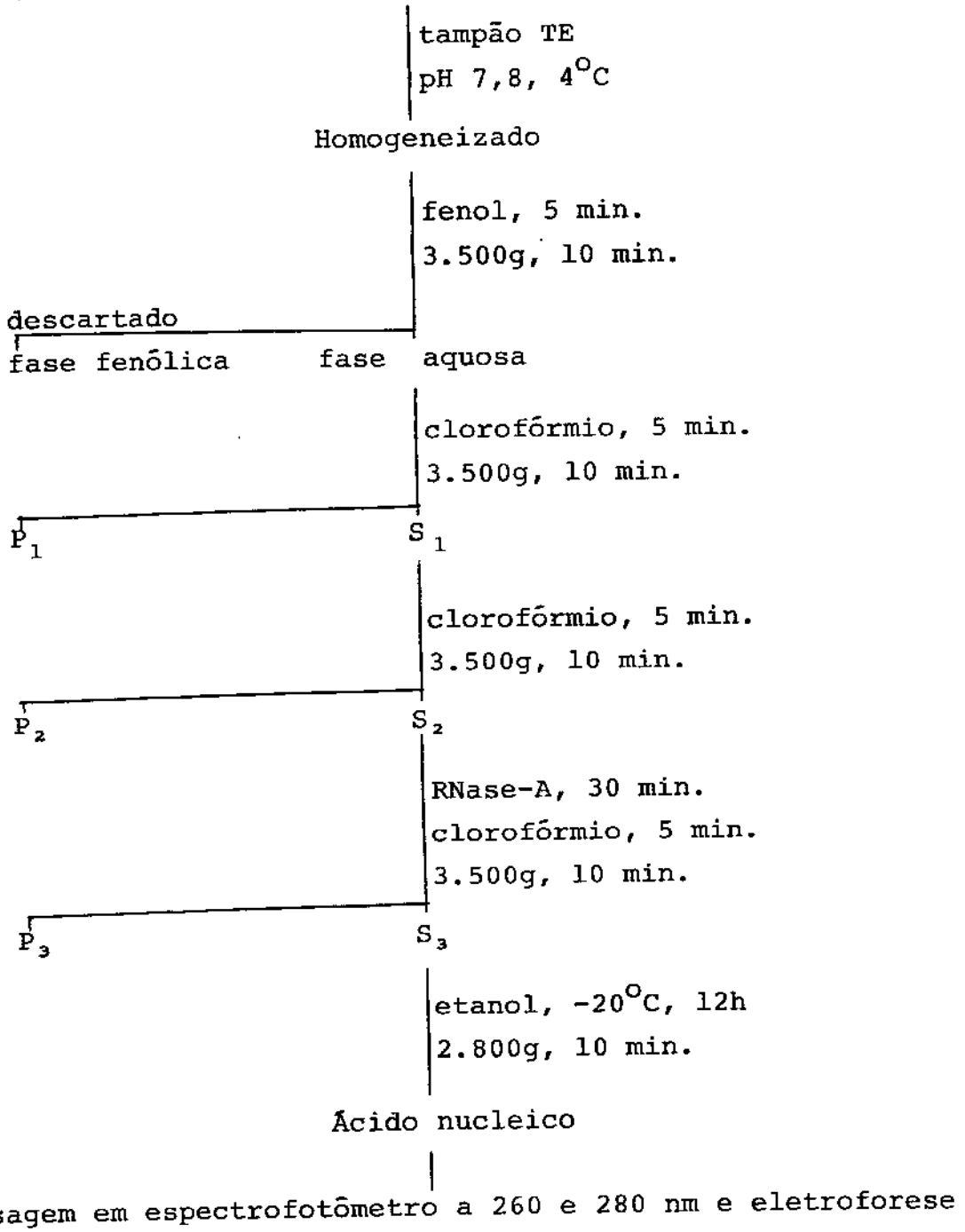
O grau de pureza (R) da preparação foi determinado segundo MANIATIS et alii (1982). Para analisar a interferência do fenol na dosagem de DNA e na estimativa do grau de pureza (R) da preparação foi realizado um experimento balanceado com três concentrações de DNA e seis de fenol, tendo sido utilizados vários testes de comparações múltiplas e transformação dos dados.

### 3.7 Eletroforese em gel de agarose

Amostras de DNA total de macerado de espécies de Pratylenchus extraídos de culturas assépticas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml), segundo MANIATIS et alii (1982). A corrida eletroforética foi seguida em placa horizontal a 100 V e 50 mA durante 1h em tampão Tris-Borato-EDTA pH 8,2 (tampão TBE) e revelada por luz ultravioleta a 260 nm. O peso molecular do ácido nucleico separado pela eletroforese foi estimado através da utilização de um padrão de PM, o fago  $\lambda$  digerido por EcoRI/Hind III.

ESQUEMA 2. Extração de DNA total de macerado de espécies de Pratylenchus.

Pratylenchus spp extraídos de culturas assépticas



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 Manutenção e aumento das culturas assépticas de espécies de Pratylenchus

É interessante considerar que uma forma para ser obtido inóculo puro de nematóides migradores do gênero Pratylenchus é através de culturas monoxênicas, onde temos uma espécie conhecida associada a uma espécie primária em condições de cultura, condições físicas e químicas do meio de desenvolvimento controladas e as interferências das condições climáticas minimizadas. Vários autores têm relatado métodos para manutenção e propagação de culturas assépticas de Pratylenchus (ZUCKERMAN, 1971; KRUSBERG, 1979; LIMA, 1982; RIEDEL et alii, 1983; CASTRO, 1986).

A manutenção e aumento das culturas foi baseada na metodologia descrita por LIMA (1982; FIGURA 1). A utilização desta metodologia se mostrou efetiva para as três espécies de Pratylenchus testadas uma vez foi conseguido um aumento do número de culturas iniciais (TABELA 3). A percentagem de contaminação das culturas por bactérias diminuiu progressivamente. Isto deve estar relacionado à prática adquirida com o tempo e também a modificação no processo de esterilização das sementes de alfafa. O maior número de culturas obtidas foi de P. zeae, embora tendo partido de um número inicial maior de culturas, a percentagem de

contaminação destas foi sempre menor. A contaminação ocorreu de modo geral antes da inoculação dos nematóides.

Os experimentos foram sempre testado com P. zaeae e depois de padronizados foram utilizadas as outras espécies.

Com relação aos métodos de esterilização de sementes de alfafa, os resultados foram expressos pelo percentual de placas com meio de RIEDEL sem 2,4 D que apresentaram contaminação por bactérias, após 7 dias da adição e manutenção das sementes esterilizadas, mantidas no escuro, à temperatura ambiente (TABELA 4). Foi observado que a utilização de hipoclorito de sódio combinado à formalina e ao SDS foi o método mais eficiente, reduzindo a contaminação para 4,3% e também não interferiu na percentagem de germinação das sementes. A eficiência desta solução pode ser atribuída ao aumento do espectro de ação. O pré-tratamento térmico das sementes não foi eficiente no controle da contaminação. Foram observados dois tipos de colônias bacterianas que não foram identificados.

Foi testada a eficiência de dois meios de cultura na reprodução de P. zaeae, P. penetrans e P. brachyurus em calos de alfafa cv. Crioula. Os resultados destes testes foram expressos pelas médias do número de nematóides e peso fresco do calo de cultura, comparados pelo testes de Tukey (TABELA 5).

FIGURA 1. Fases de obtenção de culturas assépticas de espécies de Pratylenchus. A. Plântulas de alfafa em meio de RIEDEL sem 2,4 D; B. Plântulas de alfafa em meio de RIEDEL; C. Cultura asséptica de Pratylenchus.

A



1 cm

B



C



TABELA 3. Avaliação da quantidade de culturas monoxênicas de Pratylenchus zeae, P. penetrans e P. brachyurus e percentagem de contaminação, após 30 dias da obtenção das culturas.

<u>P. zeae</u>				<u>P. penetrans</u>				<u>P. brachyurus</u>			
Qt. inicial de culturas	Qt. total de culturas	Qt. culturas após 30 dias	% contam.	Qt. inicial de culturas	Qt. total de culturas	Qt. culturas após 30 dias	% contam.	Qt. inicial de culturas	Qt. total de culturas	Qt. culturas após 30 dias	% contam.
38	76	67	11,8	8	16	10	37,5	21	42	28	33,3
35	70	61	12,8	10	20	13	35,0	23	46	31	32,6
37	74	64	13,5	12	24	17	29,2	24	48	35	27,1
46	92	81	11,9	10	20	14	30,0	21	42	31	26,2
40	80	74	7,5	10	20	17	15,0	26	52	42	19,2
44	88	82	6,8	14	28	23	17,8	28	56	46	17,8

Os dados referentes ao número de nematóides foram transformados em log, pois verificada a não homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Pela análise de variância desses dados foi verificado que tanto para P. brachyurus quanto para P. penetrans não houve diferença significativa, ao nível de 5%, entre o meio simplificado de RIEDEL et alii (1973) e o de MURASHIGE e SKOOG (1962). Foram encontrados maiores números de P. zaeae no meio simplificado de RIEDEL, diferindo estatisticamente do meio de MURASHIGE e SKOOG, ao nível de 5% de probabilidade.

CASTRO (1986) estudando a influência de meios de cultura na reprodução de P. brachyurus, P. zaeae, além de outras espécies de nematóides, obteve reprodução de P. brachyurus tanto em meio de RIEDEL et alii como no de MURASHIGE e SKOOG, não mostrando diferença significativa ao nível de 5%, comparados pelo teste de Tukey. No caso de P. zaeae maiores números foram observados no meio simplificado de RIEDEL et alii, havendo diferença significativa entre este e o meio de MURASHIGE e SKOOG. Esses resultados comparados aos obtidos nesse experimento revelaram que o meio simplificado de RIEDEL et alii (1973) propiciou reprodução e desenvolvimento de P. zaeae, P. penetrans e P. brachyurus igual ou superior ao meio de MURASHIGE e SKOOG (1962) de constituição mais complexa.

A análise de variância dos dados referentes a peso



TABELA 4. Eficiência de alguns métodos de esterilização de sementes de alfafa (Medicago sativa L.) cv. Crioula, expressa pelo percentual de placas com meio de RIEDEL sem 2,4 D contaminadas com bactérias após a adição e manutenção das sementes por sete dias no escuro a temperatura ambiente. Médias de 10 repetições.

Método esterilização	Quantidade sementes	% germinação	% placas contaminadas
Pré-trat, térmico + hipoc. sódio 5%	55	85,3	44,2
Hipoc. sódio 5%	55	81,8	46,7
Hipoc. sódio 5% + formalina 5% + SDS 1%	55	83,6	4,3
Controle sementes	55	79,8	100,0
Controle ambiente*	--	--	0,0

\* controle para contaminações provenientes do ambiente externo

TABELA 5. Análise da variância da reprodução de Pratylenchus zaeae, P. penetrans e P. brachyurus em calos de alfafa cv. Crioula, incubados por 90 dias em dois meios de cultura diferentes. Médias de cinco repetições.

Meio	Número de Nematóides*			Peso de Calo(g)
	<u>P. zaeae</u>	<u>P. penetrans</u>	<u>P. brachyurus</u>	
RIEDEL <u>et alii</u> (1973)	5,03 <sup>a</sup> **	5,20 <sup>a</sup> **	5,22 <sup>a</sup> **	0,33 <sup>a</sup> **
MURASHIGE e SKOOG (1962)	3,68 <sup>b</sup>	4,07 <sup>a</sup>	4,07 <sup>a</sup>	0,70 <sup>b</sup>

\* Dados transformados em log.

\*\* Médias seguidas pela mesma letra, para cada parâmetro, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

fresco do calo (TABELA 3) revelou um efeito estatisticamente significativo ao nível de 5% de probabilidade, dos dois meios testados, sobre o desenvolvimento do calo. O meio de MURASHIGE e SKOOG propiciou maior desenvolvimento dos calos, quando comparado ao meio de RIEDEL, porém, não foi o melhor para a reprodução dos nematóides. LIMA (1982) ao estudar a influência de meios de cultura na reprodução de P. penetrans em calos de alfafa, ervilha, cenoura e batata encontrou correlação negativa entre o peso do calo e a reprodução dos nematóides. Resultados semelhantes foram obtidos por CASTRO (1986) que ao estudar a influência de meios de cultura na reprodução de P. brachyurus e P. zaeae, encontrou correlação negativa entre o peso de tecido cultivado e a reprodução dos nematóides.

A composição do meio de cultura e a concentração de seus constituintes são fatores importantes para o desenvolvimento dos tecidos vegetais, bem como para a reprodução dos nematóides. Através dos dados obtidos (TABELA 5) pode ser concluído que o meio que proporcionou maior desenvolvimento do calo não propiciou maior reprodução das três espécies de Pratylenchus testadas, confirmando que o meio de RIEDEL et alii (1973), de composição simplificada, é o mais recomendado.

#### 4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS de proteínas totais de espécies de Pratylenchus

Amostras de proteínas totais obtidas de macerado de espécies de Pratylenchus foram dosadas pelo método de BRADFORD (1976), antes da aplicação no gel de eletroforese. Este método é sensível, rápido e apropriado para dosar amostras depois de tratadas com tampão da amostras, pois, evita interferência de íons e detergente. As amostras com concentração em torno de 2,8mg/ml foram as melhores resolvidas (cerca de 15 µg de proteína no gel), através da coloração por prata.

Através da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foram obtidas 26 bandas para P. zaeae, 20 para P. penetrans e 28 para P. brachyurus. Além de 22 bandas proteicas comuns para P. zaeae e P. brachyurus e 18 para P. penetrans, foram obtidas bandas com PM de 55.000, 26.000, 16.000 e 14.000 d para P. zaeae; com PM de 50.000, 36.000 e 19.000 d para P. penetrans e com PM de 39.000, 34.000 e 23.000 d para P. brachyurus (FIGURAS 2 e 3). Foram consideradas apenas as bandas que se reproduziram em diversos experimentos.

Uma variedade de técnicas eletroforéticas têm sido utilizadas para identificação e caracterização de nematóides fitoparasitas, porém, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho de eletroforese de proteínas de nematóides do gênero Pratylenchus.

FIGURA 2. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS para proteínas totais de macerado de Pratylenchus zae (Pz), P. penetrans (Pp) e P. brachyurus (Pb). Gel corado por prata. Os PM em daltons são indicados ao lado da figura.

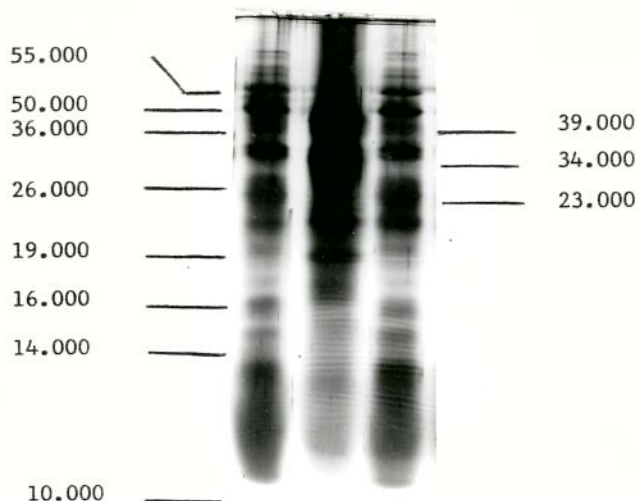
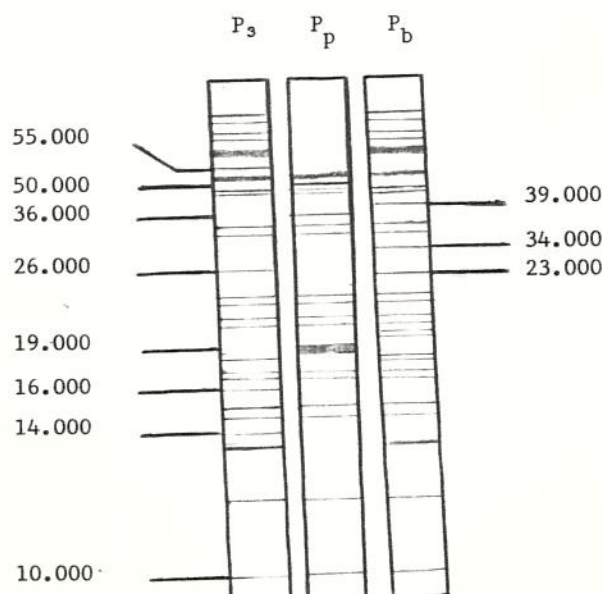


FIGURA 3. Esquema do perfil eletroforético de proteínas de macerado de P. zae (Pz), P. penetrans (Pp) e P. brachyurus (Pb). Os PM em daltons são indicados ao lado da figura.



BAKKER et alii (1988) utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS conseguiram caracterizar Globodera rostochiensis e G. pallida. Os autores obtiveram resultados bastante reprodutivos com esta técnica. HUETTEL et alii (1983), utilizando a mesma técnica não obtiveram diferenças entre as raças citrus e banana de Radopholus similis. FRIEDMAN et alii (1977) conseguiram identificar várias linhagens de Caenorhabditis elegans e C. briggsae, a partir do padrão proteico obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. No presente trabalho foram encontradas quatro bandas proteicas para P. zaeae três para P. penetrans e três para P. brachyurus, com PM diferentes. A análise do perfil eletroforético de proteínas totais sugere que P. zaeae e P. brachyurus parecem ser mais próximas do que P. penetrans, o que pode estar relacionado ao comportamento das espécies, uma vez que tanto P. zaeae como P. brachyurus são espécies partenogenéticas e a presença de machos é de ocorrência bastante rara (ROMAN e HIRSHIMANN, 1969), enquanto que P. penetrans é uma espécie bissexual.

#### 4.3 Testes de dupla difusão em ágar de macerado total de espécies de Pratylenchus

Antissoros contra P. zaeae (AsPz), P. penetrans (AsPp) e P. brachyurus (AsPb) foram obtidos após seis inoculações em coelhos, via linfonóculo, de macerado total de nematóides.

Os antissoros obtidos apresentaram reação positiva, com apenas uma linha de precipitação, tanto para o antígeno homólogo como para os heterólogos (FIGURA 4). Os antissoros obtidos não reagiram com macerado total de Meloidogyne graminicola. Tais resultados sugerem que as espécies estudadas têm parentesco serológico muito próximo. Autores sugerem que maiores diferenças possam ser encontradas com a utilização de anticorpos monoclonais (SCHOTS, 1988).

#### 4.4 Eletroforese em gel de agarose de DNA total de macerado de espécies de Pratylenchus

Para eletroforese em gel de agarose foram utilizadas preparações de DNA total com grau de pureza (R) em torno de 1,8. Os valores de R foram obtidos através dos valores de densidade óptica a 260 e 280 nm das preparações (FIGURA 5).

Como resultado da eletroforese em gel de agarose foram obtidas bandas de ácido nucleico características para P. zae com PM de  $0,07 \times 10^6$  d; para P. penetrans com PM de 19,16; 1,41;  $0,62$  e  $0,09 \times 10^6$  d e ainda uma banda com PM de  $0,08 \times 10^6$  d para P. brachyurus (FIGURA 6 e 7).

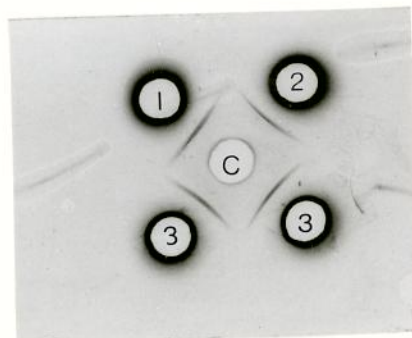
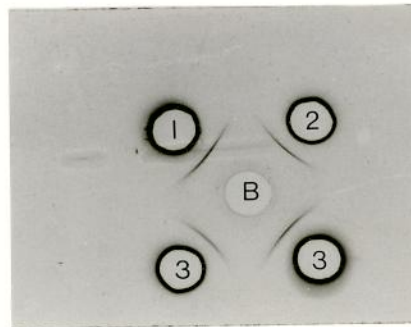
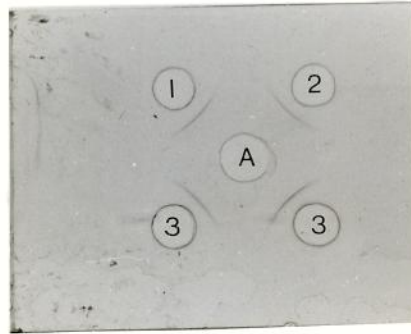
Alguns autores têm relatado diferenças entre espécies, raças e populações de nematóides fitoparasitas utilizando

eletroforese em gel de agarose, principalmente de fragmentos de restrição. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho de eletroforese de DNA de espécies de Pratylenchus. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram diferenças entre as três espécies de nematóides estudados e sugerem que P. zeae e P. brachyurus são espécies mais próximas, do que P. penetrans. Isto deve estar relacionado ao fato das duas primeiras espécies serem partenogênicas e a última bissexual. Tem se acreditado que muitas espécies de nematóides fitoparasitas criam populações genotipicamente diferentes rapidamente por mutação e seleção clonal via partenogênese (CURRAN et alii, 1986).

Apesar da eletroforese em gel de agarose ser uma técnica relativamente fácil, a eliminação total do fenol das amostras de DNA, algumas vezes leva a perdas de ácido nucleico. Assim foram feitos estudos da interferência do fenol em três concentrações diferentes de DNA através da análise de variância por vários testes de comparações múltiplas e foram obtidas diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade somente entre os níveis de fenol para os valores de absorbância a 260 e 280 nm para DNA com concentração de 7 µg/ml. Os valores de R para esta concentração, bem como para concentrações maiores de DNA e os valores de densidade ótica, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados sugerem que não é necessário eliminar todo o fenol das preparações, o que geralmente leva a perdas de ácido nucleico e pode reduzir o tempo de preparo das amostras.



FIGURA 4. Reações de dupla difusão em ágar de macerado total de espécies de Pratylenchus. A. Antissoro AsPz; B. Antissoro AsPp; C. Antissoro AsPb; 1. Macerado total de P. zaeae; 2. Macerado total de P. penetrans; 3. Macerado total de P. brachyurus.



FUGURA 5. Gráfico de densidade ótica de 200-300 nm de DNA total de macerado de Pratylenchus zae (A); P. penetrans (B) e P. brachyurus (C).

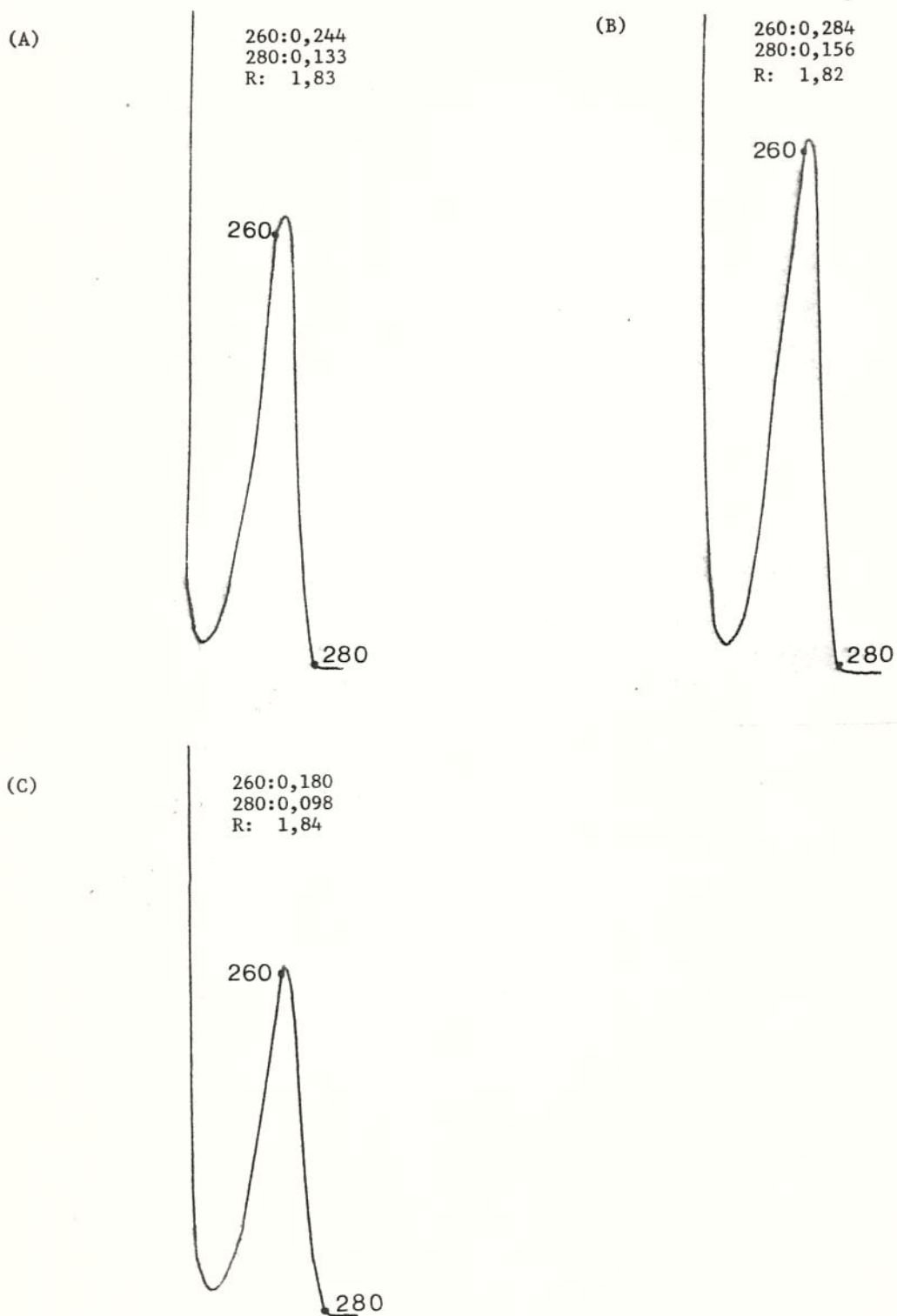


FIGURA 6. Perfil eletroforético em gel de agarose de DNA total de macerado de Pratylenchus zeae (Pz); P. penetrans (Pp) e P. brachyurus (Pb). Gel corado por brometo de etídio. Os PM em  $10^6$  daltons são indicados ao lado da figura.

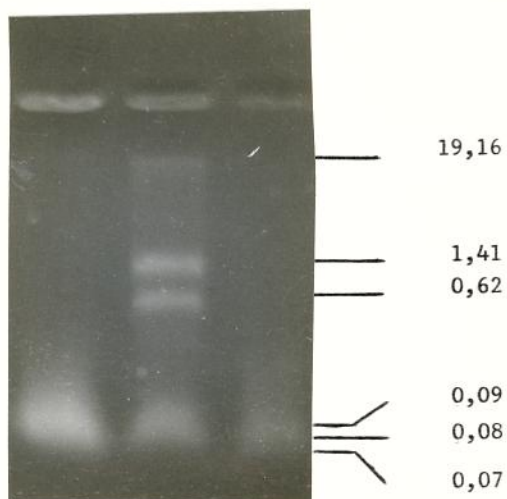
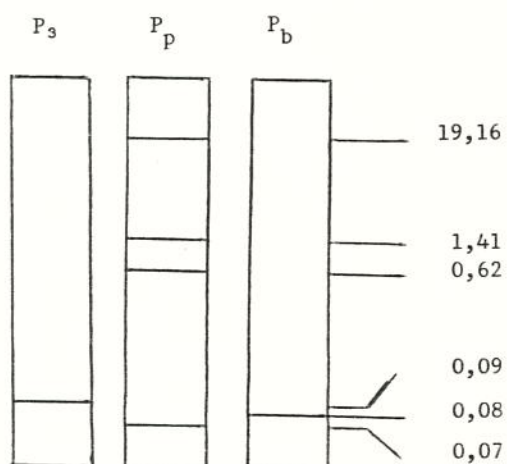


FIGURA 7. Esquema de perfil eletroforético em gel de agarose de bandas de DNA total de macerado de Pratylenchus zeae (Pz); P. penetrans (Pp) e P. brachyurus (Pb). Os PM em  $10^6$  daltons são indicados ao lado da figura.



## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

1. O método mais eficiente na esterilização de sementes de alfafa foi o que utilizou hipoclorito de sódio 5% combinado à formalina 5% e ao SDS 1%.
2. O meio de RIEDEL et alii (1973) mostrou ser tão eficiente quanto o de MURASHIGE e SKOOG, de composição mais complexa, para reprodução de P. zaeae, P. penetrans e P. brachyurus.
3. A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS de proteínas totais de macerado de nematóides mostrou ser eficiente na separação das espécies testadas revelando padrão proteico característico para P. zaeae com bandas de PM de 55.000, 16.000 e 14.000 d; para P. penetrans com PM de 50.000, 36.000 e 19.000 d e para P. brachyurus com PM de 39.000, 34.000 e 23.000 d.
4. Os testes de dupla difusão em ágar revelaram uma linha de precipitação dos antígenos com os antissoros homólogos e heterólogos, porém, não reagiram com macerado total de Merlodygyne gramnicola.

5. A análise de DNA total de macerado de nematóides revelou um perfil característico para cada espécie, revelando uma banda com PM de  $0,07 \times 10^6$  d para P. zaeae; bandas com PM de 19,16; 1,41; 0,62 e  $0,09 \times 10^6$  d para P. penetrans e ainda uma banda com PM de  $0,08 \times 10^6$  d para P. brachyurus.
  
6. A análise da interferência do fenol nas medidas de densidade ótica a 260 e 280 nm de preparações com três concentrações de DNA revelou diferenças estatisticamente significativas a nível de 5% de probabilidade para os valores de densidade ótica para DNA com concentração de 7 µg/ml, através da análise de variância por vários testes de comparações múltiplas. Na estimativa do R para todas as concentrações, bem como para os valores de densidade ótica de DNA mais concentrados, não houve interferência do fenol.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- BANKER, J. Protein variation in cyst nematode. Agricultural University Wageningen, Holanda, 1987. 159p. (Tese de Doutorado).
- DARON, J.C. Méthode d'obtention et étude immunologique des protéines solubles de juvéniles d'une population naturelle de Meloidogyne. Cah. ORSTOM, sér. Biol., X:273-282, 1975.
- BENTON, A.W. e MYERS, R.F. Esterases patterns of Ditylenchus triformis and Panagrellus redivivus. Nematologica, 12:495-500, 1966.
- BERGÉ, J.B. e DALMASSO, A. Caractéristiques biochimiques de quelques populations de Meloidogyne hapla et Meloidogyne spp. Cah. ORSTOM, sér. Biol., X:263-271, 1975.
- BIRD, A.F. Serological studies on the plant parasitic nematode Meloidogyne javanica. Parasit., 15:350-360, 1964.
- BLUM, H.; BEIER, H. e GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8:93-99, 1987.

BOLLA, R.I.; WEAVER, C. e WINTER, R.E.L. Genomic differences among pathotypes of Bursaphelenchus xylophilus. J. Nematol. 20:309-316, 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Anal. Biochem., 72:248-254, 1976.

CASTRO, M.E.A. Multiplicação "in vitro" de *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus zeae*, *Radopholus similis* e *Tylenchorhynchus* sp. Universidade Federal de Viçosa, MG, 1986. 62p. (tese de Mestrado).

COOLEN, W.A. e D'HERDE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Minist. Agric. Res. Admis. State. Agric. Res. Centre, Ghent. Bélgica, 1972. 77p.

CURRAN, J.; BAILLE, D.L. e WEBSTER, J.M. Use for genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. Parasitology, 90:137-144, 1985.

CURRAN, J.; McCLURE, M.A. e WEBSTER, J.M. Genotypic differentiation of Meloidogyne populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. J.Nematol., 18:83-86, 1986.

- DALMASSO, A. e BERGÉ, J.B. Molecular polymorphis and phylogenetic relationships in some Meloidogyne spp: application the taxonomy of Meloidogyne. J. Nematol., 10:323-332, 1978.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404-427, 1964.
- DICKSON, D.W.; HUISINGH, D. e SASSER, J.N. Dehydrogenasis, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected Meloidogyne, Ditylenchus, Heterodera e Aphelenchus spp. J. Nematol., 3:1-16, 1971.
- DICKSON, D.W.; SASSES, J.N. e HUISINGH, D. Comparative disc-electrophoretic protein analyses of selected Meloidogyne, Ditylenchus, Heterodera and Aphelenchus spp. J. Nematol., 2: 286-293, 1970.
- FARGETTE, M. Use of the esterases phenotype in the taxonomy of the genus Meloidogyne. 1. Stability of the esterases phenotype. Revue Nématol., 10:39-43, 1987.
- FARGETTE, M. Use of the esterases phenotype in the taxonomy of the genus Meloidogyne. 2. Esterases phenotypes observed in West African populations and their characterization. Revue Nématol., 10:45-56, 1987.



- FRANCO, J. Disc electrophoresis of female proteins of British and Peruvian potato cyst-nematode populations, Globodera spp. nematologica, 25:35, 1979.
- FRIEDMAN, P.A.; PLATZER, E.G. e EBY, J.E. Species differentiation in Caenorhabditis briggsae and Caenorhabditis elegans. J. Nematol., 9:197-203, 1977.
- GEORGI, L.; YODER, O.C. e VANWERT, S. Comparison of restriction endonuclease fragments of ribosomal DNA from Meloidogyne javanica and Meloidogyne incognita. J. Nematol., 18:609, 1986.
- GIBBINS, L.N. e GRANDISON, G.S. An assessment of serological procedures for the differentiation of biological races of Ditylenchus dipsaci. Nematologica, 14:184-188, 1968.
- GORDON, A.H. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. In: T.S. WORK e E. WORK, eds Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. North Holland Publishing Co., 1970. Vol. I, parte 1, p.7.147.
- GREET, D.N. e FIRTH, J. Influence of host plant on electrophoretic protein patterns of some round-cyst neatode females and use of larvae to obtain less ambiguous results. Nematologica, 23:411-415, 1977.

- HANSEN, E.L. e DUECHER, E.J. Symposium: current approaches to the Problems of systematic nematology. J. Nematol., 2:1-6, 1970.
- HELLING, R.B.; GOODMAN, H.M. e BOYER, H.W. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. J. Virol., 14:1235-1244, 1974.
- HUETTEL, R.N.; DICKSON, D.W. e KAPLAN, D.T. Biochemical identification of two races of Radopholus similis by polyacrylamide gel electrophoresis. J.Nematol., 15:345-348, 1983.
- HUSSEY, R.S. Biochemical systematics of nematodes - A review. Helminthol. Abstr., series B, plant Nematol. 48:141-148, 1979.
- HUSSEY, R.S. Serological relationship of Meloidogyne incognita and M. arenaria. J.Nematol., 4:101-104, 1972.
- HUSSEY, R.S. Serological relationships in root-knot (Meloidogyne spp) nematodes. J. Nematol., 3:314 (abstr.), 1971.
- HUSSEY, R.S. e KRUSBERG, L.R. Disc-electrophoretic patterns of enzymes and soluble proteins of Ditylenchus dipsaci and Ditylenchus triformis. J. Nematol., 3:79-84, 1971.

- HUSSEY, R.S.; SASSER, J.N. e HUISINGH, D. Disc-electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of Meloidogyne incognita and Meloidogyne arenaria. J. Nematol., 4:183-189, 1972.
- KALINSKI, A. e HUETTEL, R.N. DNA restriction fragment length polymorphism in races of the soybean cyst nematode, Heterodera glycines.
- KRUSBERG, L.R. e BABINEAU, D.E. Applications of plant tissue culture to plant nematology, in: W.R. SHARP; P.O. LARSEN; E. F. PADDOCK e V. RAGHAVEN, eds. Plant cell and tissue culture; Principles and Applications. Columbus, Ohio State University Press, 1979, p.401-419.
- LEE, S.H. Attempts to use immunodiffusion for species identification of Meloidogyne. Nematologica, 11:41, 1965.
- LIMA, M.M.A. Physical and chemical factors affecting reproduction of Pratylenchus species in monoxenic culture. Columbus, The Ohio State University, 1982. 73p. (Tese de Doutorado).
- LORDELLO, I.G.E. Nematóides das plantas cultivadas. Biblioteca Rural Livraria Nobel S/A, 1986, 314p.

- LORDELLO, L.G.E.; MONTEIRO, A.R. e D'ARCE, R.D. Distribuição geográfica dos nematóides nocivos ao cafeeiro. Revta. Agric. Piracicaba, 43:79-81, 1968.
- McCLURE, M.A.; MISAGHI, I. e NIGH, E.L. Shared antigens of parasitic nematodes and host plants. Nature, 244:306-307, 1973.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. e SAMBROOK, J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p.150-161; 458-463 e 468-469.
- MISAGHI, I. e McCLURE, M.A. Antigenic relationship of Meloidogyne incognita, M. javanica and M. arenaria. Phytopathology, 64:698-701, 1974.
- MOUNTAIN, W.B. A method of culturing plant parasitic nematodes under sterile conditions. Proc. Helminthol. Soc.Wash., 22: 49-52, 1955.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497, 1962.
- OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção via linfonódulo. Summa Phytopathologica, 1: 61-64, 1975.

- ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:321-349, 1964.
- PABLEO, E.C.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. e KLOOS, W.E. DNA isolation and GC base composition of four root-knot nematode (Meloidogyne spp) genomes. J. Nematol., 20:1-8, 1988.
- POWERS, T.O.; PLATZER, E.G. e HYMAN, B.C. Meloidogyne mitochondrial DNA. J.Nematol., 18:627, 1986.
- POWERS, T.O. e SANDALL, L.J. Estimation of genetic divergence in Meloidogyne mitochondrial DNA. J. Nematol., 20:505-511, 1988.
- RADICE, A.D.; POWERS, T.O.; SANDALL, L.J. e RIGGS, R.D. Comparisons of mitochondrial DNA from the sibling species Heterodera glycines and Heterodera schatii. J. Nematol., 20:443-450, 1988.
- RIEDEL, R.M.; LIMA, M.M.A. e MARTIN, M. Establishment of nematode germplasm banks. In: D.A. EVANS; W. R, SHARP; P.V. AMMIRATO e Y. YAMADA, eds. Handbook of plants cell culture. MacMillan Publidhings Co., New York, 1983, Vol. 1, p.881-903.
- RIEDEL, R.M.; FOSTER; J.G. e MAI, W.F. A simplified medium for monoxenic culture of Pratylenchus penetrans and Ditylenchus dipsaci. J. Nematol., 5:71-72, 1973.

- RIGGS, R.D.; RAKES, L. e HAMBLEN, M.L. Morphometric and serological comparisons of a number of populations of cyst nematodes. J. Nematol., 14:188-199, 1982.
- ROMAN, J. e HIRSHMANN, H. Morphology and morphometrics of six species of Pratylenchus. J. Nematol., 1:363-386, 1969.
- SCHOTS, A. A serological approach to the identification of potato cyst neamtodes. Agricultural University, Wageningen, Holanda, 1988, 118p. (Tese de Doutorado).
- SCOTT, H.A. e RIGGS, R.D. Immuno-electrophoretic comparisons of three plant-parasitic nematodes. Phytopathology, 61:751-752, 1971.
- SVASTI, J. e PANIJPAN, B. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Chem. Educ., 54:560-562, 1977.
- TRUDGILL; D.L. e CARPENTER, J.M. Disk electrophoresis of proteins of Heterodera species and pathotypes of Heterodera rostochiensis. Ann. Appl. Biol., 69:35-41, 1971.
- TRUDGILL, D.L. e PARROT, D.M. Disc electrophoresis and larval dimensions of British, Dutch and other populations of Heterodera rostochiensis, as evidence of the existence of two species, each with pathotypes. Nematologica, 18:141-148, 1972.

VEECH, J.A.; STARR, J.L. e NORDGREN, R.M. Production and partial characterization of stylet exudate from adult females of Meloidogyne incognita. J. Nematol., 19:463-468, 1987.

WEBSTER, J.M. e HOOPER, D.J. Serological and morphological studies on the inter and intraspecific differences of the plant-parasitic nematodes Heterodera e Ditylenchus. Parasitology, 58:879-891, 1968.

ZUCKERMAN, B.M. Gnotobiology. In: B.M. ZUCKERMAN; W.F. MAI e R.A. RHODE, eds. Plant parasitic nematodes. New York, Academic Press, Inc., 1971, Vol. II, p.159-184.