

O GÊNERO *MELOIDOGYNE* E A MELOIDOGINOSE PARTE III - RESENHA HISTÓRICA

ROMERO MARINHO DE MOURA^{1,2,3}

¹Academia Brasileira de Ciência Agronômica, Recife, Pernambuco.

²Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, Pernambuco.

³Universidade Federal de Pernambuco, Instituto de Ciências Biológicas,
Departamento de Micologia, Recife, Pernambuco.

Autor para correspondência: romeromoura@yahoo.com.br.

Resumo: Esta revisão, de cunho histórico, tem três objetivos. O primeiro, compor um novo capítulo da série de quatro seções de revisões programáticas sobre o tema: “O gênero *Meloidogyne* e a Meloidoginose”. As Partes I e II foram publicadas no periódico “Revisão Anual de Plantas” (RAPP), nos anos 1996 e 1997, respectivamente. Esta, portanto, é a Parte III. Em segundo lugar, esta publicação visa organizar o histórico da taxonomia do nematoide-das-galhas e dos assinalamentos da doença meloidoginose, em sequência cronológica, permitindo a exposição de valiosa relação de bibliografias para os estudiosos desse importantíssimo grupo de fitopatógeno. Finalmente, por meio desta publicação, é prestada homenagem, *in memoriam*, àquele que foi um dos expoentes da Fitopatologia e da Nematologia brasileira: o Prof. Dr. José Júlio da Ponte.

Termos para indexação: revisão, nematóide das galhas.

THE GENUS *MELOIDOGYNE* AND THE ROOT-KNOT DISEASE – PART III. A HISTORIC REVIEW

Abstract: This review was conceived with three objectives. The first, to complement one set of reviews on the topic “The Genus *Meloidogyne* and the Root-Knot Disease”, programmed for four Parts. Part I and Part II were published by the Annual Review of Plant Pathology (Revisão Anual de Patologia de Plantas), a Brazilian scientific journal, in 1996 and 1997, respectively. So, this is Part III. The second objective was to build up a sound compilation on the main historical records of the occurrence of the root-knot nematode and its first taxonomic nominations, in a chronological sequence. The last objective was to honor, *in memoriam*, one brilliant Brazilian plant pathologist and plant nematologist: Prof. Dr. José Júlio da Ponte; one life dedicated to the study of plant diseases and to the genus *Meloidogyne*.

Index terms: review, root-knot nematode.

Nota do Autor

Prof. Dr. José Júlio da Ponte
(1935-2013)

Professor José Júlio da Ponte era engenheiro agrônomo, professor e pesquisador de Fitopatologia e de Nematologia Agrícola na Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, Ceará. Foi meu companheiro científico desde os tempos de mestrado em Piracicaba, final dos anos sessenta, quando fomos orientados pelo Prof. Luis Gonzaga E. Lordello. O Prof José Júlio nos deixou recentemente, encerrando uma profícua carreira profissional. Foi ganhador de títulos honoríficos, obtidos à luz da sua competência profissional e produção científica. Inteligente, brilhante e muito irreverente, Júlio da Ponte, como era mais conhecido, tornou-se personagem inesquecível, especialmente para os seus ex-alunos e colegas de ofício, que estimavam e admiravam o mestre de excepcional oratória. A esse profissional, que muito contribuiu com a Fitopatologia e Nematologia, especialmente para o conhecimento do gênero *Meloidogyne*, é dedicado, *in memoriam*, este trabalho.

Romero Marinho de Moura

APRESENTAÇÃO

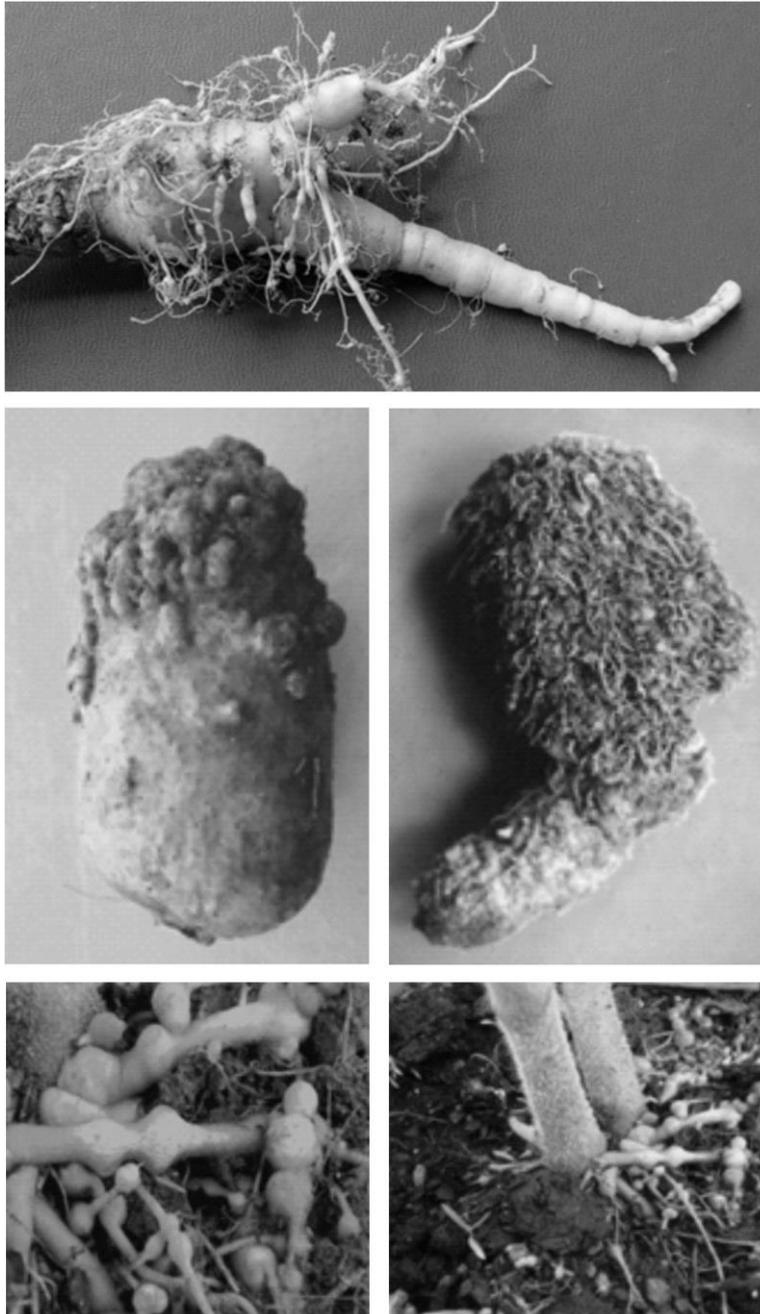
Há suficientes evidências, constatadas em campos agrícolas, mercados consumidores e pesquisas científicas, que comprovam que a doença meloidoginose, ou doença-das-galhas, encontra-se entre os mais importantes problemas fitossanitários da agricultura mundial. Na literatura inglesa, esse mal é referido como *root-knot disease*. A meloidoginose, que incide tanto em plantas cultivadas quanto em vegetação natural, é causada pelo fitonematoide

endoparasito-sedentário *Meloidogyne* spp. Göldi, de ampla distribuição mundial Sasser (1980). Levantamentos feitos em muitos países revelaram perdas anuais estimadas em 15% da produção agrícola, causadas por diferentes espécies desse parasito (CARRTER; SASSER, 1982). É possível que a meloidoginose tenha sido observada desde as antigas civilizações, porque a maioria das plantas, quando afetadas por esse mal, apresenta formações bizarras, constituídas por galhas (semelhantes a tumores), engrossamentos e outras anomalias hipertróficas, em órgãos subterrâneos. A meloidoginose, que é o termo mais utilizado no Brasil, é consequência de um processo simbiótico desarmônico, relativo à interação planta- nematoide, resultando em sintomatologia característica. É devido a esse tipo de sintoma que a doença é referida popularmente por doença-das-galhas e o agente causal por nematoide-das-galhas ou *root-knot disease* na literatura inglesa. Galhas, hipertrofias e más formações são muito evidentes em raízes tuberosas e tubérculos, que são culturas produtoras de alimentos, em quase todos os continentes, desde a antiguidade. Quando portadores de sintomas da meloidoginose, esses produtos agrícolas tuberosos perdem o valor comercial e, em algumas localidades, não são consumidos, devido à crença popular de que fazem mal à saúde. A cenoura, o tomateiro, o inhame-da-costa e o cará São Tomé são bons exemplos desses casos (Figura 1). Além de causar perdas agrícolas em todo o mundo, a meloidoginose é de difícil controle e as práticas preventivas oneram significativamente os custos de produção. Nesta revisão, são mostrados dados históricos sobre os temas nematoide-das-galhas e meloidoginose, com breves discussões. Foi dada ênfase aos assinalamentos da doença e à taxonomia do agente causal (Figura 2), assuntos polêmicos ainda hoje.

SÉCULO XIX

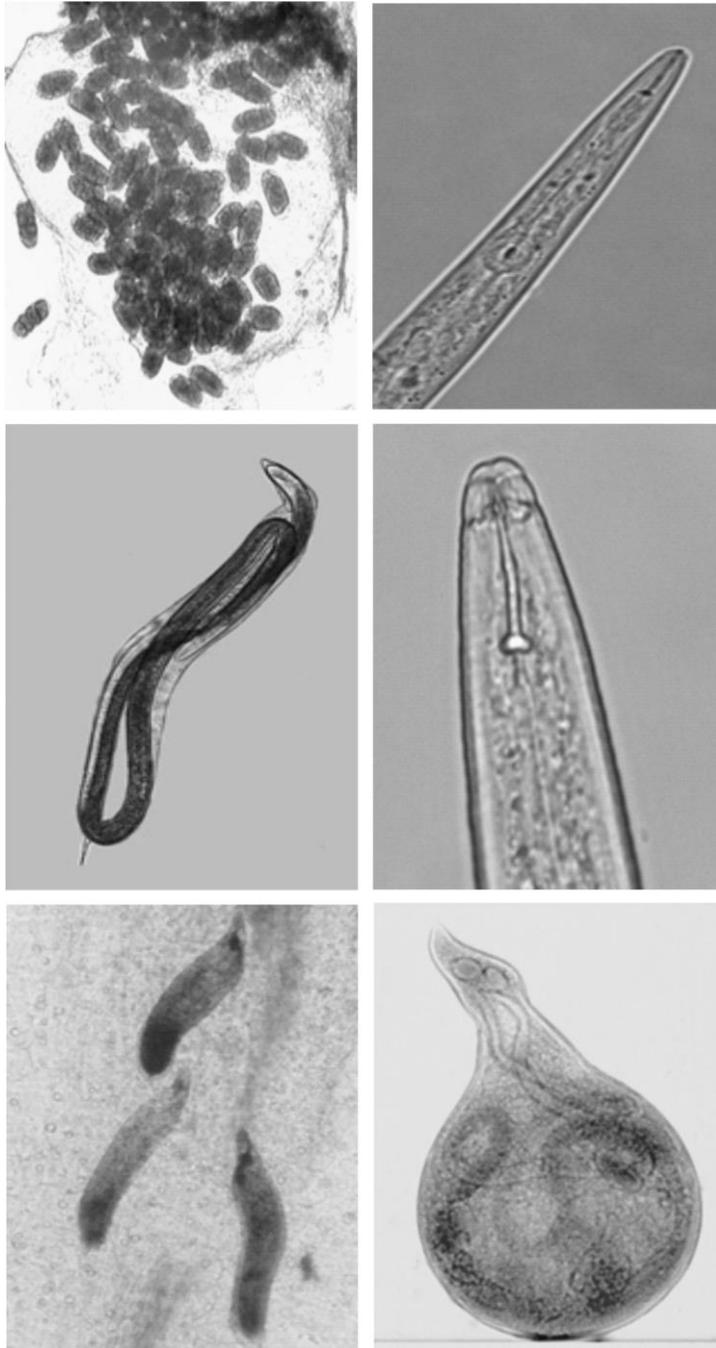
O histórico do nematoide-das-galhas e da meloidoginose teve início, pode-se assim dizer, com a epidemia de uma doença, também de origem nematológica, que ocorreu na Europa, na metade do século XIX. Sua ação foi devastadora e provocou a destruição da maioria dos campos de beterraba-açucareira (*Beta vulgaris*) especialmente na Alemanha, com significativas consequências sócio-econômicas. A síndrome observada nos campos de produção era composta por plantas com as folhas amarelas, aparentando subnutrição, e produtividade

Figura 1. Sintomas da meloidoginose: galhas e deformações em cenoura, inhames e tomateiro.



(Fotos/crédito: R.M. Moura)

Figura 2. De cima para baixo: massa de ovos, região anterior de juvenil J2; macho em formação e região anterior; juvenis em desenvolvimento dentro da raiz e fêmea adulta.



(Fotos/crédito: R.M. Moura)

irrisória. A raiz tuberosa era pequena, em relação àquelas das plantas sadias, e cobertas por raízes secundárias, referidas como *hairy roots*. Tudo indicava que se tratava de exaustão do solo, fenômeno que passou a ser conhecido pelos alemães como *rübenmüdigkeit* (enfraquecimento da beterraba). O mal se disseminou entre as propriedades agrícolas e causou altas perdas, primeiramente reportadas por H. Schacht, em 1859 (SCHACHT, 1859), na Alemanha. No século XIX, a beterraba-açucareira era a principal opção para produção de açúcar na Europa, portanto, estavam ameaçadas a sociedade e a soberania do Velho Continente, pois os seus portos estavam fechados devido ao “Bloqueio Continental”, impedindo, também, a importação do açúcar. A doença permaneceu sem diagnóstico por anos. Pouco mais de uma década após a publicação do trabalho de Schacht, a causa do *rübenmüdigkeit* foi identificada e descrita como sendo causada pelo nematoide *Heterodera schachtii* n.gen. n.esp., por A. Schmidt (SCHMIDT, 1871), na Alemanha. Bem mais tarde, Strubell (1888), também na Alemanha, publicou um estudo morfológico sobre o nematoide de modo tão detalhado (*Untersuinchungen über den Bau und die Entwicklung des Rüben-Nematoden, Heterodera schachtii Schmidt*) que, segundo muitos especialistas em taxonomia, até os dias de hoje, pouco foi acrescentado à morfologia geral básica dessa espécie. *Heterodera schachtii* juntamente com as demais espécies que seriam descritas no século XX passaram a constituir um grupo denominado nematoides-de-cisto, por serem as únicas que formavam cisto, uma estrutura de resistência para proteção dos ovos e sobrevivência do organismo no campo, especialmente quando sob condições ambientais desfavoráveis. No processo, as fêmeas adultas não conseguem expelir todos os ovos e morrem. A cutícula, então, se torna rígida, formando o cisto. Os nematoides-de-cisto não induzem galhas. Mas, qual é a relação entre os trabalhos de Schmidt (1871) e Strubell (1888) com os nematoides- das-galhas, que pertencem a outro grupo parasitário? É neste ponto que começa o histórico do nematoide-das-galhas e o porquê se encontra em um fato ocorrido em 1872, ano seguinte ao trabalho de Schmidt. Naquela ocasião, o naturalista R. Greeff, também na Alemanha, verificou e estudou um quadro sintomatológico de natureza parasitária em quatro espécies de plantas gramíneas, caracterizado por hipertrofias radiculares, ou galhas (em alemão: *gallen*), que continham nematoides no seu interior. Essa teria sido a primeira associação entre galhas e nematoides. As espécies de planta foram:

Poa annua, *Triticum repens*, *Sedum* sp. e *Dodartia orientalis*. As observações de Greeff foram publicadas no trabalho intitulado: *Ueber Nematoden in Wurzelanschwellungen (Gallen) Verschiedener* (A respeito de nematoides em diferentes hipertrofias (galhas) radiculares) (Greeff, 1872). Essa publicação daria margem a interpretações equivocadas, provocando controvérsias no histórico do nematoide-das-galhas, em especial no que concerne ao nome científico do parasito. Devido à presença de galhas na descrição sintomatológica feita por Greeff, algumas pessoas passaram a acreditar que o trabalho daquele autor teria sido o primeiro assinalamento do real nematoide-das-galhas, o que não é verdade, conforme será mostrado adiante. Greeff nomeou o nematoide encontrado nas galhas como *Anguillula radicola* Greeff, 1872. É importante lembrar, neste ponto, que outros organismos podem induzir formações radiculares semelhante às galhas da meloidoginose. Evidentemente, essas formações não possuem internamente o mesmo tipo de agente causal. São indutores de galhas radiculares espécies de certos fitonematoides, a exemplo de *Ditylenchus* spp., *Hemicycliophora* spp. e *Xiphinema* spp., entre outros. Também, alguns insetos, caso de *Phylloxera vastatrix* em videira, e bactérias nitrificantes, quando das associações com leguminosas. Na Fitopatologia são conhecidos os sintomas induzidos pela fitobactéria *Agrobacterium tumefaciens*, causadora da galha-de-coroa, em muitas culturas, e pelo fungo *Plasmodiophora brassicae*, em diversos tipos de brássicas. Portanto, a simples presença de galhas radiculares não indica obrigatoriamente casos de meloidoginose.

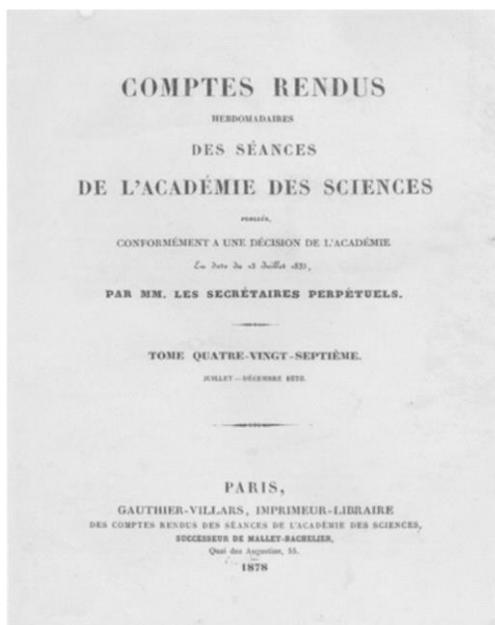
Três anos após o trabalho de Greeff, o naturalista italiano G. Licopoli, na Itália, relatou a presença de pequenos vermes dentro de galhas radiculares da planta *Sempervivum tectorum*. Seu trabalho: *Sopra alcuni tubercoli radiculari continente anguillole* (LICOPOLI, 1875) foi publicado nos Anais da Academia de Ciência de Nápoles, um periódico de pouca circulação e, portanto, de difícil consulta na época. O autor não deu nenhuma designação ao parasito, mencionando-o, apenas, como um anguillula (pequeno verme). Analisando a descrição original apresentada por Licopoli, Whitehead (1968), um dos mais importantes revisores do grupo dos nematoides-das-galhas, conforme será mostrado adiante, afirmou ter convicção de que o trabalho de Licopoli foi, de fato, a primeira constatação da meloidoginose. Essa afirmação, entretanto, não foi seguida pelos autores posteriores a Whitehead.

Em 1878, M. C. Jobert, natural da França, veio ao Brasil para estudar

uma doença que afetava significativamente a produção do principal artigo de exportação do país: o café. As conclusões dos seus estudos foram fundamentadas em observações de campo e nas formas do nematoide encontrado associado à doença. Toda a matéria foi publicada em um artigo com o título: *Sur une maladie du caféier au Brésil*, nos Anais da Academia de Ciência de Paris (JOBERT, 1878) (Figura 3). Na matéria, em duas páginas, sem figuras, o autor se referiu à ocorrência de uma doença em cafeeiros na localidade Cantagalo, província do Rio de Janeiro. No trabalho, Jobert fez descrições sintomatológicas e registrou a presença de um verme e de ovos, contendo larvas (*sic*), no interior de nodosidades (nodosités). Tratava-se do nematoide-das-galhas e esse fato seria confirmado nove anos após, em 1887. O autor não mencionou os assinalamentos precedentes da doença e, quanto ao organismo associado, afirmou se tratar de um *anguillule* (*anguillula*, do Latim *anguillulan*, diminutivo de *anguis*: cobra, serpente, enguia, mais o sufixo *ula*). No francês, *anguillule* é sinônimo de pequeno verme e nematoide. O assinalamento foi na Fazenda São Clemente. Jobert comparou plantas sadias com plantas doentes e locais de ocorrência. Discutiu nodosidades radiculares e referiu-se ao nematoide também pelo termo *kysts*. Afirmou que poderia existir “*plus de 30 millions d’ Anguillules par Caféier*”, (mais de 30 milhões de vermes por planta).

Em 1879 foi criada uma segunda designação binominal para o agente da doença-das-galhas. O responsável foi o francês M. Cornu, por meio de matérias publicadas nos Anais da Academia de Ciência de Paris. Cornu desenvolveu observações histológicas detalhadas em galhas de raízes de *Onobrychis sativa*, distinguindo-as daquelas causadas *Phylloxera vastatrix*, inseto sugador do sistema radicular da videira, que induz galhas ou tumores radiculares. Aliás, o estudo desse inseto era o principal objetivo da sua pesquisa: *Études sur le Phylloxera vastatrix*, Cornu, (1879a). A segunda publicação (CORNU, 1879b) foi: *Sur une maladie qui fait périr lês rubiacées dès serres chaudes (Anguillules)*. Essas investigações, que foram desenvolvidas na localidade Chateuneuf-sur-Loire, na França, possuem densidade científica, sendo ricas em detalhes biológicos e, por isso, foram bem aceitas pelos naturalistas. Nos trabalhos, especialmente em Cornu (1879b), o autor apresentou dados sobre desenvolvimento embrionário do nematoide-das-galhas, suas formas biológicas e modificações histológicas em tecidos infestados. Segundo Franklin (1957), Cornu, em seus comentários, pensava que o nematoide que tinha em mãos fosse relacionado com *Heterodera schachtii*. Por isso, sentindo-se inseguro, não teve condições de

Figura 3. A publicação da Academia de Ciências da França, onde se encontra o trabalho de C.E. Jobert (1878) sobre a meloidoginose do cafeeiro.



(Foto/crédito: R.M. Moura)

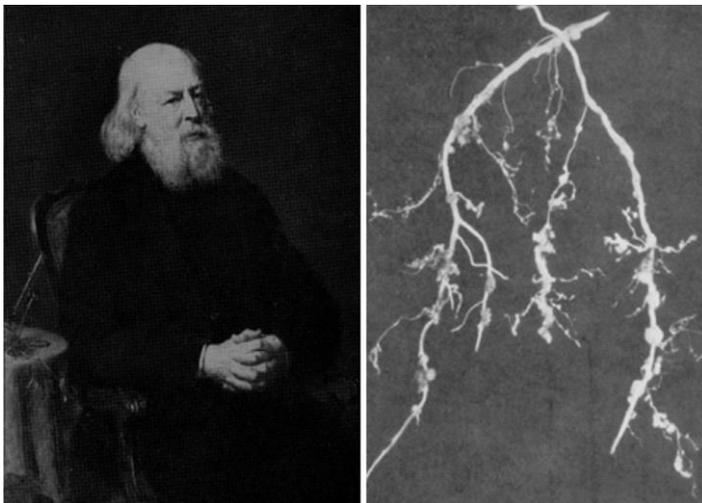
colocá-lo no gênero *Heterodera* e preferiu criar uma nova designação: *Anguillula marioni* (CORNU, 1879).

Na década seguinte, outro naturalista alemão criou divergências na evolução histórica dos assinalamentos e designações do nematoide-das-galhas, devido ao seu trabalho: *Mitteilungen über die unseren kllturpflanzen schädlichen das geschlecht Heterodera bildenden würmer* (MÜLLER, 1884). De fato, tendo esse autor encontrado plantas das mesmas espécies botânicas analisadas por Greef em 1872, igualmente portadoras de galhas radiculares, concluiu que, o que tinha em mãos, era o mesmo parasito. Na ocasião, Müller decidiu por um novo diagnóstico taxonômico. Por acreditar que o achado se tratava de um novo assinalamento do gênero *Heterodera*, descrito pelo seu compatriota Schmidt em 1871, evitou o nome genérico *Anguillula*, usado por Greef, e criou a combinação *Heterodera radicola* (Greef, 1872) Müller, 1884. A designação *Heterodera radicola* para o nematoide-das-galhas se popularizou e foi utilizada até 1932, perdurando, pois, 48 anos. Essas e outras ocorrências registradas pouco circulavam devido às dificuldades de comunicação da época. Entretanto, em 1885, foi publicado o primeiro assinalamento da doença-das-

galhas em um periódico de ampla circulação e ao alcance da maioria dos naturalistas. O autor foi M. J. Berkeley (Figura 4), na Inglaterra. Berkeley era um reverendo católico e micólogo, famoso no mundo científico pelos seus trabalhos e pesquisas com fungos fitopatogênicos. A doença-das-galhas foi assinalada em raízes de pepino (*Cucumis sativus*), cultivado em casa de vegetação (Figura 4). Berkeley publicou suas observações no *Gardner's Chronicle*, com o título *Vibrio forming cysts on cucumber* (BERKELEY, 1885). Na ocasião, o autor registrou uma associação entre a doença e um pequeno verme, que denominou de *Vibrio*. O termo *vibrio* já havia sido utilizado para designar gênero de outros nematoides (*Vibrio tritice* Steinbuch, 1799 = *Anguina trititici* (Steinbuch, 1799) Chitwood, 1935). Com as suas informações convincentes publicadas em um periódico que estava ao alcance de muitos de seus pares, Berkeley passou a ser considerado o primeiro a assinalar a doença *root knot*. Entretanto, a denominação do agente causal permaneceu na mesma situação, pois o termo *Vibrio* não viria a ser repetido pelos autores seguintes, ao se referirem aos nematoides-das-galhas.

Nas décadas finais do século XIX foram feitos alguns assinalamentos da meloidoginose que merecem destaque. O primeiro por Treub (1885), em

Figura 4. Reverendo J. M. Berkeley o primeiro autor a relatar a ocorrência do nematoide-das-galhas em um periódico de larga circulação. À direita, em foto histórica, sintomas da meloidoginose em raízes de pepino, conforme Berkeley (1885).

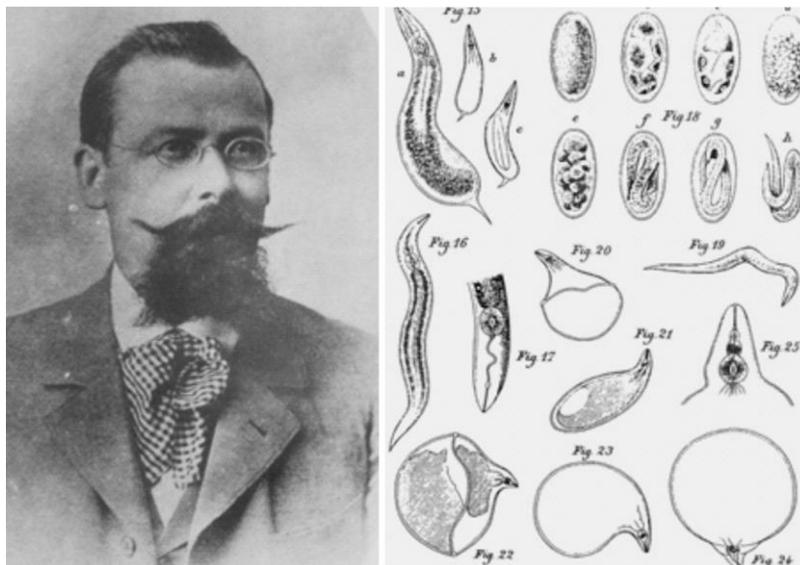


(Fotos/crédito: esquerda - *British Mycological Society & American Phytopathological Society* e direita - T. Goodey)

cana-de-açúcar, em material originário do Jardim Botânico de Buitenzorg, em Java. Treub identificou o parasito como *Heterodera javanica*, distinguindo-o de *Heterodera radiculicola* por micrometria. Complementando o estudo, o autor fez descrições de detalhes morfológicos. Desde o seu assinalamento, esse parasito passou a ser referido como “o nematoide da cana-de-açúcar” e ficou reconhecido como um dos principais problemas fitossanitários dessa gramínea. O segundo assinalamento de destaque foi de Göldi, dois anos após, no Brasil. Göldi (Figura 5), que era suíço, mais tarde naturalizado brasileiro, foi, igualmente ao Joubert, convidado pelo Governo Imperial brasileiro para estudar e pesquisar um importante problema sanitário do cafeeiro; aliás, o mesmo anteriormente reportado por Jobert, em 1878. A doença permanecia sem solução e constituía ameaça à produção nacional dessa rubiácea. As perdas devido à doença eram altas e as áreas produtoras de café da ainda província do Rio de Janeiro eram aos poucos transformadas em canaviais, devido à baixa produtividade dos cafezais. A prevalência da cultura da cana naquela região, por isso, permaneceu até hoje. Após alguns anos de pesquisas, Göldi publicou seus resultados de campo e de laboratório na forma de relatório, em 1887 (Göldi, 1887). No relatório, o autor fez o assinalamento do nematoide-das-galhas, indicando-o como o agente etiológico da doença. Documentou quantitativamente as perdas impostas à cultura e descreveu, com detalhes o parasito em todos os estádios de desenvolvimento (Figura 5), e mostrou as principais vias de disseminação da doença. Pela primeira vez, o nematoide-das-galhas era apresentado como causador de perdas econômicas significativas na agricultura, semelhantemente ao que havia sido registrado por Schacht em 1859 na Alemanha, quando da ocorrência do nematoide-de-cisto da beterraba-açucareira. Ainda sobre a patologia, Göldi se tornou o primeiro a constatar uma interação entre um fungo (pela micrografia apresentada por Göldi, aparentemente, o gênero do fungo era *Rhizoctonia*) e o parasitismo do nematoide-das-galhas, aumentando a severidade da doença. Jobert (1878) já havia mencionado a presença de micélio fúngico em tecidos infectados pelo nematoide-das-galhas. No diagnóstico do parasito, Göldi criou o nome genérico *Meloidogyne* (*melon* = melão; *gyne* = fêmea), ou seja, fêmeas em forma de melão, e descreveu *Meloidogyne exigua* Göldi como a espécie-tipo. Essa espécie passou a ser referida como o “nematoide-do-cafeeiro”. Devido à riqueza dos detalhes fitopatológicos e nematológicos, considerados de excepcional qualidade para a época, o trabalho de Göldi, que teve por título:

“Relatório sobre uma moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro”, foi reeditado na categoria de Clássico Fitopatológico por R.M. Moura, em 1998, (MOURA, 1998). Como apêndice da publicação, foi incluído o artigo de Jobert (1878), em francês. Ainda, devido às dificuldades nas comunicações científicas do século XIX, essa importante publicação, que institucionalmente era, e ainda é, da responsabilidade do Museu Nacional do Rio de Janeiro, não teve circulação adequada entre os naturalistas da época.

Figura 5. E. A. Göldi, pesquisador e biólogo. Naturalidade suíça, mais tarde brasileira. Criador do termo *Meloidogyne*, trabalhando no Brasil, em 1887. À direita, detalhada micrografia feita por Göld mostrando estádios e estruturas do nematoide-das-galhas.



(Fotos/crédito: Museu Goeldi e E.A. Göldi, respectivamente)

Ainda na última década do século XIX, o norte-americano N. A. Cobb, em seu trabalho Cobb (1890), quando ainda se encontrava no início da sua vida profissional, que aconteceu na Europa, relatou a ocorrência da doença-das-galhas em batatais no País-de-Gales, causando perdas significativas. Esse pesquisador, de invulgar talento científico, e que viria a ser aclamado como “Pai da Nematologia Norte-Americana”, confessou-se incapaz de reconhecer a espécie do parasito, o que comprova as dificuldades que os pesquisadores encontravam na identificação taxonômica desse organismo. As últimas publicações sobre assinalamentos do nematoide-das-galhas no século XIX

foram de pesquisadores norte-americanos, trabalhando nos Estados Unidos. A primeira foi a de Neal (1889), com o registro da doença em amendoazeiro e outras culturas, na Flórida. O autor se referiu ao agente causal com uma nova designação: *Anguillula arenaria* Neal. Ainda, relativamente ao nematoide, Neal descreveu pontos fundamentais do ciclo de vida. Mais adiante, porém ainda no mesmo ano, Atkinson (1889) publicou dados básicos do ciclo de vida do nematoide-das-galhas, identificado, no seu estudo, pela antiga denominação *Heterodera radicum*. Nada de novo no que concerne à taxonomia do parasito foi acrescentado. Esses dois autores relataram diferenças em susceptibilidade de algumas espécies de planta, após terem sido inoculadas com o nematoide. Enquanto umas se mostraram susceptíveis à vista de um autor, essas mesmas espécies de planta, à vista do outro, se mostraram resistentes. Essas observações seriam consideradas valorosas no futuro por outros pesquisadores, por ocasião dos estudos de variações em parasitismo entre populações de campo.

SÉCULO XX

Na passagem do século XIX para o século XX, as denominações *Heterodera radicum* e *Anguillula marioni* eram as únicas utilizadas para o nematoide-das-galhas. O termo *Meloidogyne*, criado por Göldi em 1887 no Brasil, até então, não havia sido mencionado.

O primeiro assinalamento do nematoide-das-galhas no século XX foi em videiras, por meio de duas publicações de um mesmo autor (LAVERGNE, 1901a, b). Na oportunidade, esse autor nomeou o nematoide de *Anguillula vialae*; uma nova designação. Os dois artigos trouxeram informações imprecisas e dignas de questionamento, segundo Whithead (1968). Realmente, nesse sentido, as mensurações de ovos encontrados por Lavergne, que foram da ordem de 20-30 μm de comprimento, não correspondiam à realidade e foram consideradas incorretas. Whitehead argumentou afirmando que esses valores correspondiam à metade do valor médio para qualquer espécie do gênero. Os estudos sobre os nematoides-das-galhas praticamente cessaram durante a primeira década do século XX, devido a Guerra Mundial (1914- 1918), que quase destruiu a Europa e paralisou os Estados Unidos.

Após a Grande Guerra, em 1919, aconteceu um fato, hoje histórico, que seria considerado nos discussões relativas ao tema taxonomia dos nematoide-

das-galhas, trinta anos mais tarde. Tudo ocorreu em um quartel do Exército, em *Camp Travis*, no Texas, Estados Unidos. Dois médicos parasitologistas, C. A. Kofoid e W. A. White encontraram ovos tidos como estranhos, com alta frequência, em análises de fezes de soldados. Segundo esses dois médicos, os ovos seriam de um parasito intestinal de humanos, ainda não descrito. Nas investigações, não foram encontradas formas adultas, nem juvenis. Diante das seguidas constatações, Kofoid e White tomaram a iniciativa de fazer um registro científico, que foi publicado com o título: *A new nematode infection in man*, no *Journal of American Medical Association* (KOFOID; WHITE, 1919). Os autores afirmaram que os ovos eram produzidos por um *Oxyuris*, que foi designado *Oxyuris incognita* n.sp. Mais tarde, Sandground (1924), nematologista de plantas, em sua publicação: *Oxyuris incognita or Heterodera radiculicola?* demonstrou que o trabalho de Kofoid e White era fantasioso, pois não se tratava de ovos de um parasito de humanos e sim do nematoide-das-galhas, presentes em alimentos consumidos pelos soldados. Dois anos antes dessa contestação, Sandground (1922) já havia dado provas da sua competência ao ter sido o primeiro a sugerir a possibilidade da existência de mais de uma espécie entre populações dos nematoides-das-galhas. Sua teoria se fundamentava em contagens da produção de massas de ovos e eclosão de juvenis em plantas de batata e antúrio. As suas conclusões, entretanto, não foram precisas e não receberam crédito suficiente, especialmente porque o autor alegou que outros fatores poderiam ser responsáveis pelas variações do padrão reprodutivo do nematoide que tivera em mãos. Cobb (1924), de volta aos Estados Unidos e, agora, cientificamente famoso, fez incursões no estudo de identificação dos nematoides-das-galhas, porém sem sucesso. Acreditando que existiam diferenças morfológicas suficientes entre o nematoide-das-galhas (*Heterodera radiculicola*) e o nematoide-de-cisto (*Heterodera schachtii*), resolveu criar o subgênero *Caconema*, formando o binômio *Caconema radiculicola* (Greeff, 1872), Cobb, 1924. A diferenciação se fundamentou em quatro caracteres que se encontram presentes nos nematoides-das-galhas: 1- presença de bochechas (*cheeks*), que seriam alargamentos dos lábios laterais, protegendo as aberturas anfidiais; 2- ser tipicamente endoparasito; 3- ser possuidor de maior diversidade parasitária (maior número de espécies de plantas hospedeiras); 4- pelo fato dos machos possuírem apenas um testículo. Esta nova denominação não prevaleceu.

Tom Goodey (1932a,b), analisando originais na Inglaterra, revelou que o nematoide encontrado e descrito por Greeff em 1872 em raízes de gramíneas,

na Alemanha, não era o real nematoide-das-galhas, nem o nematoide-de-cisto, conformesupôs Müller em 1884. Tratava-se, sim, de uma espécie de *Anguillulina* (endoparasito migrador), descrito por Gervais e Von Beneden em 1859, contendo apenas formas vermiformes. *Anguillulina* Gervais; Von Beneden 1859 é sininímia de *Ditylenchus* Filipjev 1936, conhecido por “nematoide dos caules e dos bulbos”. Goodey fundamentou a sua conclusão afirmando que, ao criar o binômio *Heterodera radicolica* em 1884 Müller certamente não havia lido o trabalho de Greef (1872), nem examinado convenientemente o próprio material que tivera em mãos (*sic*). Se assim tivesse procedido, teria constatado que Greef não mencionou as formas biológicas do nematoide-das-galhas, as quais, certamente, não estariam também no material que tivera em mãos e que originou a sua publicação. Entretanto, em atitude respeitosa, ao revisar o então gênero *Anguillulina*, Goodey (1932a) considerou o termo *radicolica*, colocando-o no binômio *Anguillulina radicolica* (Greef, 1882) Goodey, 1932. Igualmente, por ocasião da revisão do grupo dos nematoides dos caules e dos bulbos, com a consequente criação do gênero *Ditylenchus*, Filipjev (1936) levou em consideração o trabalho de Greef (1872), nomeando uma das espécies *Ditylenchus radicolus* (Greef, 1872) Filipjev 1936. Goodey, porém, continuou acreditando que o nematoide-das-galhas pertencia ao gênero *Heterodera*. Devido a isso, e considerando o histórico dos fatos acima mencionados, substituiu o nome específico criado por Müller (1884), pela designação específica de Cornu (1879b), formando um novo binômio: *Heterodera marioni* (Cornu, 1879) Goodey, 1932 (GOODEY, 1932a,b). É importante registrar que a publicação de Goodey (1932b) foi o primeiro livro texto publicado de Fitonematologia e que teve por título: *Plant Parasitic Nematodes and the Diseases they Cause*. A impressão gráfica, as fotos, as micrografias e mesmo o conteúdo são ainda hoje reconhecidos como de alta qualidade. Por fim, outra publicação que pode ser considerada, direta ou indiretamente, relacionada com a taxonomia dos nematoides-das-galhas; a de Taylor (1933), na qual o autor relatou a reprodução do nematoide-das-galhas na ausência de machos, fato, aliás, abordado preliminarmente por Byars (1914).

Grande vazio científico ocorreu durante a ascensão do Social Nacionalismo Alemão e a segunda Grande Guerra Mundial (1939-1945), especialmente na Europa. Assim, dezessete anos se passaram desde os trabalhos de Goodey (1932a,b) sem que nada de significativo acontecesse em termos de taxonomia dos nematoides-das-galhas, prevalecendo o binômio *Heterodera marioni* até 1949.

Devido à desinformação, ou opção pessoal, o binômio *Heterodera radicolica* foi também utilizado, especialmente por fitopatologistas. Em concordância, entretanto, todos acreditavam que se tratava de espécie única.

N. A Cobb nos Estados Unidos e T. Goodey na Inglaterra, até a metade do século XX, eram considerados os expoentes da Fitonematologia mundial, ambos com biografias memoráveis. Nas suas respectivas produções científicas predominam a competência e qualidade técnica. Entretanto, no que diz respeito às suas contribuições ao conhecimento da taxonomia dos nematoides-das-galhas, as suas contribuições não foram significativas. Com efeito, a criação do gênero *Caconema* por Cobb não foi adotada pelos nematologistas e o binômio *Heterodera marioni* estabelecido por Goodey foi um equívoco, pois o nematoide-das-galhas não pertence ao grupo dos nematoides-de-cisto, portanto, não deveria ter sido colocado no gênero *Heterodera*.

DIVERSIDADE PARASITÁRIA ENTRE POPULAÇÕES DE *HETERODERMA MARIONI* E O CONCEITO DE RAÇAS PARASITÁRIAS

A partir de Goodey (1932a, b), os casos de meloidoginose passaram a ser diagnosticados como causados por *Heterodera marioni*. Era uma situação semelhante ao que ocorria com *Heterodera schachtii*, desde Schmidt (1871). Os fitonematologistas acreditavam que ambas eram espécies únicas que parasitavam diferentes espécies botânicas, com *H. marioni* possuindo uma lista de hospedeiras significativamente maior. Surgiu, então, a questão: teriam todas as populações de *H. marioni* o mesmo comportamento parasitário? Com outras palavras: todas as populações do nematoide-das-galhas atacariam do mesmo modo as mesmas espécies de planta? Em 1889 essa questão havia sido preliminarmente evidenciada, analisando-se comparativamente os trabalhos de Neal (1889) e Atkinson (1889), conforme anteriormente aqui mencionado. De fato, esses dois autores relataram resultados conflitantes, ou seja, opostos, obtidos por meio de inoculações consideradas fidedignas feitas em *Amaranthus spinosus* e *Lespedeza striata*. Esse fato não chamou atenção dos pesquisadores da época. Entretanto, observações semelhantes envolvendo outros fitonematoides foram sendo feitas e catalogadas por diferentes autores no século XX, especialmente a partir dos anos de 1930. Eram identificadas populações de fitonematoides de uma espécie taxonômica que parasitavam certas espécies de planta enquanto outras populações dessa mesma espécie

não eram capazes de fazê-lo. Mais tarde, os nematologistas passaram a denominar essas populações de raças biológicas. Goodey (1932b) dedicou o último capítulo do seu livro ao tema: *Biological Races in Plant-Parasitic Nematodes*, incluindo, na ocasião, dados relativos a diversos gêneros e espécies de fitonematoides, até mesmo *Heterodera schachtii*, mas não mencionou *Heterodera marioni*. No final da década de 1930, nos Estados Unidos, surgiram fortes e novas evidências de que *H. marioni* possuía raças parasitárias. Day;Tufts (1940) revelaram inconstância da resistência de plântulas de pessegueiro da variedade *Shalil* ao parasitismo de *H. marioni*, reforçando as observações e conclusões de Neal (1889) e Atkinson (1889), que constataram o fenômeno trabalhando com outras espécies de plantas. Na década de 1940, as publicações sobre o tema se intensificaram e a primeira de destaque foi a de Sherbakoff (1940). Esse pesquisador constatou que algodoeiros eram muito parasitados pelo nematoide-das-galhas em solos anteriormente cultivados com algodoeiro, mas esse fato não ocorria quando em solos previamente cultivados com tomateiros. Finalmente, Christie; Albin (1944), Christie; Havis (1948) e Reynolds (1949), pesquisadores radicados na Flórida, comprovaram, experimentalmente, com confiabilidade acima de qualquer dúvida, que *H. marioni* possuía raças parasitárias. Tais constatações foram feitas com populações que estavam parasitando diferentes espécies vegetais, em regiões distintas dos Estados Unidos. Essas populações, devidamente catalogadas, foram mantidas sob condições de casa de vegetação, em especial na Universidade da Flórida, em Gainesville, por J. R. Christie e colaboradores. Cada população possuía um registro, formado por número e letra, indicando a relação parasitária com plantas hospedeiras e local de coleta; por exemplo, população 11D (CHRISTIE; HAVIS, 1948). Por curiosidade, essa população foi identificada mais tarde como sendo *Meloidogyne incognita* var. *incognita* por Chitwood em 1949 (CHITWOOD, 1949). Estava definitivamente comprovado que *H. marioni* possuía populações diferenciadas em parasitismo.

CRIAÇÃO DE ESPÉCIES MORFOLÓGICAS DO NEMATOIDE-DAS-GALHAS: O MÉTODO CHITWOOD

Após o descobrimento da diversidade parasitária entre populações de *Heterodera marioni*, a questão que emergiu foi a seguinte: seria possível separar taxonomicamente essas populações diferenciadas por meio de um

critério morfológico, permitindo assim a criação de diferentes espécies do nematoide? Uma resposta positiva proporcionaria uma condição em que cada espécie morfológica poderia ser relacionada com uma gama de plantas hospedeiras. Em caso positivo, as consequências agrônômicas seriam de significativo valor, pois tornaria possível o controle da meloidoginose por meio de rotação de culturas, utilizando-se plantas não hospedeiras em relação à espécie ocorrente no campo, por certo período de tempo. As pesquisas nesse sentido tiveram início na Flórida, sob liderança do mesmo J. Christie (Figura 6). De início, não foram obtidos resultados positivos. À primeira vista, ao se comparar morfológicamente espécimes das populações diferenciadas nada era constatado, reforçando-se o conceito de espécie única. Segundo J. N. Sasser (informação pessoal) B. G. Chitwood (Figura 7), que se encontrava em período sabático na ocasião, foi convidado por Christie a examinar morfológicamente e de modo comparativo as populações catalogadas da sua coleção. Chitwood era reconhecido como um dos mais notáveis nematologistas e especialista em Zoologia Geral de Invertebrados. Após exaustiva pesquisa microscópica, Chitwood obteve sucesso e publicou, em 1949, no *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, o trabalho *Root-knot nematodes – Part I. A revision of the genus Meloidogyne Goeldi 1887* (CHITWOOD, 1949). Esse trabalho ainda é considerado memorável, tanto do ponto de vista científico quanto histórico. Era a segunda revisão taxonômica do grupo; outras viriam bem mais tarde. O autor considerou como caráter diferenciador de espécies uma figura morfológica formada por estrias transversais do corpo das fêmeas adultas, circundando o períneo. Ficou demonstrado que as estrias transversais, ao atingirem a região perineal, onde se localizam ânus, vulva e fasmídios, circundam o períneo de um modo característico. Com isso, forma-se uma figura diferenciadora de populações, nos moldes da impressão digital de humanos. Essa figura passou a ser chamada padrão perineal ou configuração da região perineal (*perineal pattern*). Chitwood identificou seis modelos de padrões perineais, cada um associado a um tipo de população que atacava certas espécies de planta. As populações portadoras desse modelo ou padrão perineal passou a constituir uma espécie morfológica (Figura 7). Chitwood considerou, também, o formato dos bulbos do estilete dos machos, fêmeas e juvenis. Igualmente, levou em conta a distância da abertura da glândula dorsal à base do estilete, entre outros caracteres menos relevantes. Na prática,

todavia, esses elementos não se apresentaram consistentes. A publicação original de Chitwood é rica em micrografias, dados micrométricos e inclui adequadas microfotografias dos padrões perineais. As estruturas morfológicas de fêmeas, machos e juvenis se tornariam caracteres taxonômicos auxiliares no diagnóstico. Na prática, o caráter diferenciador de espécies passou a ser o padrão perineal. Na revisão de Chitwood foi desconsiderado o binômio *Heterodera marioni* e revalidado o termo *Meloidogyne*, criado por Göldi, no Brasil, em 1887. Foram descritas cinco espécies e duas variedades (*sic*). Quanto aos nomes das espécies, Chitwood deu crédito a antigos autores, do seguinte modo:

- 1- *Meloidogyne incognita* var. *incognita* (Kofoid & White, 1919) n.com. n.var. Chitwood, 1949;
- 2- *Meloidogyne incognita* var. *acrita* (Kofoid & White, 1919) n.var. Chitwood, 1949;
- 3- *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) n.com. Chitwood, 1949;
- 4- *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) n.com. Chitwood, 1949;
- 5- *Meloidogyne hapla* n.sp. Chitwood, 1949;
- 6- *Meloidogyne exigua* Göldi, 1887.

Os detalhes morfológicos e o padrão perineal de *Meloidogyne javanica* apresentados por Chitwood (1949) podem ser vistos como exemplo ilustrativo dessa importante publicação na figura 7.

O Método de Chitwood foi recebido com ceticismo por nematologistas e fitopatologistas, por vários motivos. Em primeiro lugar, pelos conceitos pessoais do autor, a exemplo da questão do termo *variedade* em Nematologia. Em segundo lugar, pela pouca segurança na apresentação dos dados taxonômicos, pautados por afirmações contraditórias. Em terceiro lugar, pelo fato da prática de identificação do padrão perineal ter sido considerada subjetiva e sem precisão científica. Realmente, Chitwood parecia estar com pressa ao divulgar a sua descoberta. Por exemplo, no que concerne à criação da forma *M. incognita* var. *incognita* o autor tomou uma decisão inusitada. Como base do diagnóstico, considerou as lâminas permanentes preparadas em 1919 (portanto, à época, trinta anos passados) pelos médicos C. A. Kofoid e W. A. White, já mencionados. Essas lâminas continham ovos do suposto

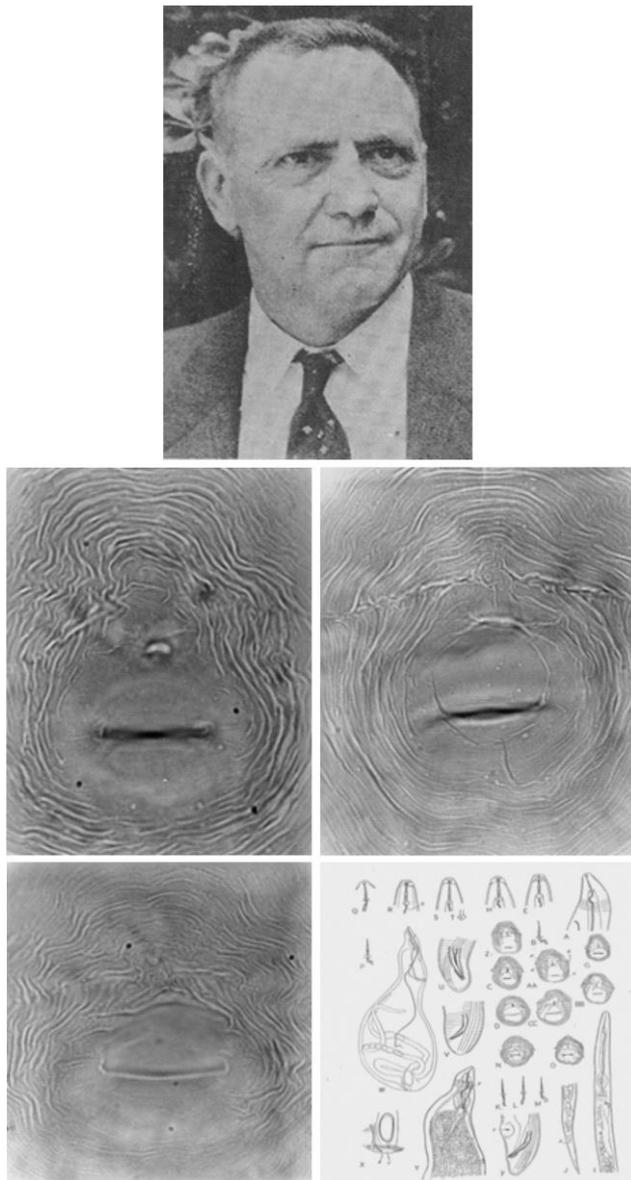
Figura 6. J. R. Christie, um dos mais notáveis nematologistas do século XX. Trabalhou na Florida, Estados Unidos. Pode ser indicado como o principal pioneiro do descobrimento de populações diferenciadas em hábito parasitário da então espécie *Heterodera marioni*, ensejando a descoberta e a descrição de espécies morfológicas por B. G. Chitwood, em 1949.



(Fotos/crédito: SON)

parasito de humanos, identificado pelos dois médicos como *Oxyuris incognito*, fato contestado por Sandground (1924). Chitwood examinou pessoalmente as lâminas dos médicos que continham ovos com os ovos de espécimes de uma população que tinha em mãos e que estava parasitando cenoura (*Daucus carota* var. *sativa*). Não encontrando diferenças, os considerou de uma mesma população e passou a identificar cenoura como hospedeiro tipo da espécie que iria criar. Em reconhecimento ao relato dos médicos, criou o binômio *Meloidogyne incognita* var. *incognita*, prestigiando a forma *Oxyuris incognito*, o suposto, nunca comprovado, parasito intestinal de humanos. Entretanto, o ponto mais discutível e que geraria controvérsias foi a justificativa para a criação de variedades (*sic*) entre os nematoides-das-galhas. De acordo com Chitwood, variedades seriam populações de uma das espécies morfológicas descritas portadoras de alterações no padrão perineal, consideradas não suficientemente marcantes para a criação de outra espécie. Essas alterações, quando consistentes, serviriam para criação de variedades. Com isso, foram

Figura 7. De cima para baixo: linha 1. B. G. Chitwood, o descobridor do padrão perineal de fêmeas adultas como padrão diferenciador de espécies do gênero *Meloidogyne*. Linha 2: *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. Linha 3. *M. arenaria* e micrografia original da descrição de *M. javanica*.



(Fotos/crédito: SON; IMP e B. G. Chitwood, respectivamente)

separadas *Meloidogyne incognita* var. *incognita* e *M. incognita* var. *acrita*. Com relação a esta última, que parasitava algodoeiro (*Gossypium barbadense*), Chitwood mostrou pouca segurança no diagnóstico ao afirmar: “*It would be remiss not to mention that twice we have encountered individual females in which the perineal pattern on one side of the body was that of Meloidogyne incognita and on the other side was one instance Meloidogyne incognita var. acrita and in the other case it was Meloidogyne javanica. Both cases occurred in mixed natural populations*”. Incongruências semelhantes podem ser vistas ao longo das demais descrições das outras espécies. Esses fatos geraram discussões.

Curiosamente, o Método de Chitwood, mesmo enfrentado críticas, despertou o interesse de muitos nematologistas que o aceitaram com entusiasmo e passaram a identificar populações de campo com razoável grau de dificuldade, mas com crescente confiabilidade. A técnica apresentava baixa complexidade e poderia ser executada por qualquer laboratorista treinado, sendo pouco dispendiosa. Os fitopatologistas foram os que mais reagiram negativamente em relação ao método e a maioria simplesmente não o aceitava. Seis anos depois, em meio às discussões reinantes, Taylor et al. (1955) publicaram no periódico *Phytopathology*, o trabalho: *Perineal patterns of root-knot nematodes*. A publicação continha muitas microfotografias de regiões perineais e uma chave dicotômica para identificação de espécies. Pelo fato de se tratar de um periódico de Fitopatologia, a publicação promoveu aumento na credibilidade do Método de Chitwood entre fitopatologistas, ansiosos por planos de rotação de culturas mais seguros e com maior fundamentação científica. Os autores confirmaram a teoria de Chitwood, afirmando que cada espécie e subespécie (foi retirado o termo variedade) possuía padrão perineal típico, diferente das outras formas taxonômicas do gênero. Afirmaram, também, que ocorrem espécimes variantes do padrão perineal típico dentro de uma mesma população. Com isso, as identificações passaram a ter mais credibilidade entre fitopatologistas. Pouco a pouco, as espécies de Chitwood passaram a ser assinaladas em outros países. Nos trópicos, tomando-se, por exemplo o Nordeste do Brasil, verificou-se a predominância das espécies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, especialmente as duas primeiras. Essas três espécies possuem padrões perineais bem definidos, fáceis de serem identificados, utilizando-se as adequadas descrições fotográficas e micrográficas contidas em Chitwood (1949). Pesquisadores nordestinos, a

exemplo de R. M. Moura e colaboradores em Pernambuco e J. J da Ponte e colaboradores no Ceará realizaram diagnósticos preciosos para os padrões da época, nas últimas décadas do século XX e início do XXI. Eram populações coletadas em diferentes estados da região, parasitando diferentes hospedeiros. São exemplos os trabalhos de Ponte; Castro (1975) e Moura et al. (2000). Na prática, o diagnóstico de uma população pelo método de Chitwood era obtido mediante análise de um mínimo de dez padrões perineais. Em uma estimativa média (Moura, dados não publicados), encontrava-se uma proporção de 60% de indivíduos com padrões perineais típicos de uma das espécies e 40% de formas intermediárias; algumas com pouca definição diagnóstica e outras atípicas; aliás, de acordo com o que havia sido indicado por Chitwood (1949) e Taylor et al. (1955). Os 60% de padrões típicos eram suficientes para o convencimento diagnóstico do analista que, muitas vezes, detectava, também, populações mistas (misturas de espécies morfológicas). No Brasil, o destaque pioneiro nas ações de identificação e descrição de espécies do gênero *Meloidogyne*, obedecendo Chitwood (1949), foi L.G.E. Lordello, nas décadas de 1950, 60 e 70, trabalhando na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, São Paulo. Lordello foi autor de diversos diagnósticos até hoje aceitos, referentes a importantes novas espécies brasileiras do nematoide-das-galhas (Figura 8).

O PÓS-CHITWOOD

Na primeira década após o trabalho de Chitwood apenas quatro novas espécies e uma subespécie (ainda com o nome de variedade, aliás, descrita pelo próprio Chitwood) foram publicadas: *Meloidogyne arenaria* var. *thamesi* Chitwood, 1952 (CHITWOOD et al., 1952); *M. brevicauda* Loos, 1953 (LOOS, 1953); *M. acronea* Coetzee, 1956 (COETZEE, 1956) e *M. inornata* Lordello, 1956 (LORDELLO, 1956).

Ainda na década de 1950, Chitwood et al. (1956) descreveram o nematoide-cistoide (*cystoid nematode*); o gênero *Meloidodera*. Esse nematoide seria definitivamente a forma intermediária entre o nematoide-de-cisto e o nematoide-das-galhas. Do nematoide dos cistos, *Meloidodera* apresentava retenção de ovos no corpo e, do nematoide-das-galhas, a não formação de cisto (endurecimento da cutícula). *Meloidodera* também se diferenciava desses

Figura 8. À esquerda: L. G. E. Lordello ao lado de R. M. Moura, seu primeiro aluno de pós-graduação. Juntos, estudaram, pela primeira vez, a utilização dos métodos de Chitwood (1949) e Sasser (1954), de modo associado, na identificação de uma população de *Meloidogyne* incognita que parecia atípica em relação ao padrão morfológico taxonômico, que caracterizava as espécies do gênero.



(Foto/crédito: R. M. Moura)

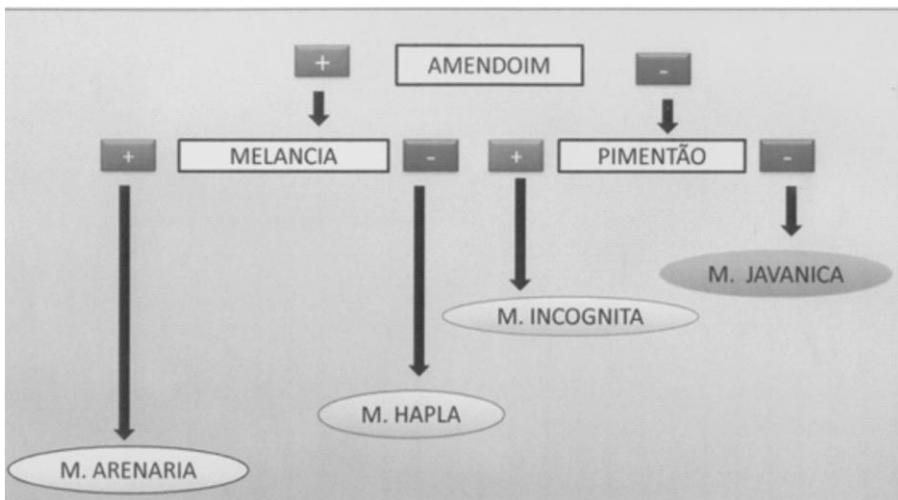
dois nematoides pela posição equatorial da vulva e, em decorrência disso, de uma longa distância entre vulva e ânus.

Em meio a dúvidas e inseguranças ainda reinantes na taxonomia do nematoide-das-galhas, Sledge; Golden (1964) criaram o táxon *Hypsoperine graminis* n. gen. e n. esp., considerando a espessura da cutícula e a região perineal elevada. Whitehead (1968) não concordou com essa nova descrição e propôs que o novo táxon fosse sinônimo de *Meloidogyne*.

O primeiro método para diagnóstico de espécie de *Meloidogyne* que surgiu após o trabalho de Chitwood foi o de Sasser (1954) (Figura 9). Esse autor relacionou as reações parasitárias de plantas diferenciadoras, ou seja, hospedeiras e não hospedeiras, com as espécies descritas por Chitwood em 1949. *Meloidogyne exigua*, o nematoide do cafeeiro, não foi incluída. A propósito, muitas vezes, as espécies descritas por Chitwood ainda são referidas como “espécies principais” (*major species*). A pesquisa de Sasser foi desenvolvida como parte da tese de doutorado do autor na *Washington University*, em *Maryland, New Jersey*, Estados Unidos, sob orientação do próprio B. G. Chitwood. Esse fato

é uma indicação de que aqueles autores buscavam alternativas para o método convencional de diagnóstico da época, que havia sido descrito há cinco anos passados. O novo método foi bem considerado pelos pesquisadores, pelo fato de ser muito prático quanto à aplicabilidade, tendo passado a ser executado em rotinas, especialmente em estações experimentais, longe de laboratórios (SASSER, informação pessoal). Alguns pesquisadores, a exemplo de R. M. Moura, utilizaram os dois métodos de modo associado em estudos de populações caracterizadas por padrões perineais atípicos (MOURA, 1976). Na prática ficou estabelecido, naquela ocasião, que as populações com variações no padrão perineal, mas com o mesmo comportamento parasitário, seriam consideradas como pertencentes à espécie mais próxima; eram as *sibling species*, (espécies irmãs). Entretanto, utilizando-se apenas do critério morfológico, alguns autores preferiam descrever essas populações como novas espécies

Figura 9. Sistema de identificação das principais espécies conhecidas do gênero *Meloidogyne*, por meio de reações de plantas diferenciadoras, segundo J. N. Sasser (1954). Legendas = (+) parasitada, (-) não parasitada. A descoberta de raças parasitárias, mais tarde, descredenciou este sistema.



(Original/crédito: J. N. Sasser; adaptado por R. M. Moura)

Não tardou para que o método de Sasser (1954) passasse a ser contestado; agora, devido às variações parasitárias de populações de uma mesma espécie morfológica. Por exemplo, o pimentão (*Capsicum annuum*), considerado

resistente a *Meloidogyne javanica* e susceptível a *M. incognita* no sistema de Sasser, foi encontrado parasitado por *M. javanica*. A maioria das populações dessa espécie não parasita o pimentão. O mesmo foi verificado em relação a *M. arenaria* e o amendoimzeiro, tido como resistente a essa espécie. Essas variações foram encontradas em outras combinações envolvendo o nematoide-das-galhas e outras plantas. Esse fenômeno deu origem à conceituação de raças parasitárias (*host races*). Sasser (1980) apresentou um critério para separação e classificação de quatro raças parasitárias de *M. incognita* e duas de *M. arenaria*. Hartman; Sasser (1985) reafirmaram a credibilidade desse método, com pequenas modificações.

Um fato viria comprometer definitivamente o uso do método de Chitwood (1949). Foi à exagerada criação de novas espécies do nematoide-das-galhas, muitas das quais fundamentadas em vagas e inconsistentes variações do padrão perineal. Esse assunto já causava preocupação entre nematologistas e fitopatologistas na década de 1950 e o trabalho de Taylor et al. (1955) pode ter sido a primeira tentativa de frear a proliferação das novas espécies, que surgiam em número elevado. Em 1955, por exemplo, já haviam sido descritas nove espécies novas, incluídas as primeiras de Chitwood em 1949. Em outras palavras, o trabalho de Taylor et al. (1955) pode ter sido uma tentativa de orientar taxonomistas-nematologistas a enquadrarem as suas descrições de novas espécies dentro dos “limites de tolerância” da dicotomia proposta. Caso tenha sido esta a intenção, não funcionou, pois o número de espécies continuou crescendo exponencialmente, ao longo das décadas seguintes. Próximo ao final dos anos de 1950 surgiu a primeira revisão sobre os nematoides-das-galhas, por M. T. Franklin (1957), nematologista de grande destaque no Reino Unido. Na revisão, entretanto, nada de novo foi acrescentado como proposta taxonômica para separação de espécies e, na década seguinte, essa autora descreveria duas espécies novas: *Meloidogyne artiellia* e *M. naasi* (FRANKLIN, 1961; 1965).

Nos anos 1960 as críticas ao método de Chitwood se intensificaram. O motivo era o mesmo: mau uso do método, resultando na criação de novas espécies. Questionava-se: como diferenciar tantos padrões perineais, na medida em que tal critério era considerado, em princípio, subjetivo? Entre os fitopatologistas, a descrença passou a ser quase total. A maioria não acreditava nas espécies novas, tornando difícil o diálogo entre fitopatologistas e nematologistas, especialmente quando o assunto envolvia

nematoide-das-galhas *versus* rotação-de-culturas. Com preocupação, mas sem contestação formal, muitos observavam a atuação dos nematologistas tidos como separatistas (*spliters*), isto é, autores que se interessavam mais por diferenças do que por semelhanças. O objetivo era a descrição de novas espécies, muitas vezes por simples vaidade profissional. No entanto, deve-se admitir que várias espécies descritas naquela época possuíam, realmente, padrão perineal diferenciado e mereciam individualização taxonômica. Um exemplo de relato brasileiro aceito pela comunidade nematológica mundial, até os dias de hoje, é a espécie *Meloidogyne coffeicola* n. sp., (Lordello; Zamith, 1960).

Os taxonomistas mais abalizados e tradicionalistas atuantes nas décadas dos anos de 1960 e 1970 reclamavam também o fato de que muitas das espécies novas não possuíam material-tipo, que deveria ser mantido vivo pelo autor da descrição, em casa de vegetação, por certo período de tempo, ou mesmo em material fixado. Isto possibilitaria aos taxonomistas mais experientes estudos sistemáticos comparativos, envolvendo espécies novas e as descritas. O fato é que, com o passar dos anos, o número de espécies cresceu em demasia e tornaram-se necessários exaustivos trabalhos de revisões taxonômicas, para separar as espécies bem descritas e bem documentadas (referidas como espécies “boas”), daquelas mal descritas e pobremente documentadas (espécies “ruins”). Em 1967, praticamente 20 anos após Chitwood (1949), Whitehead (1968) publicou a terceira revisão taxonômica do grupo. Na obra, foram consideradas 23 das espécies descritas, acrescentadas quatro novas espécies e duas novas combinações, com estabelecimento de muitas sinonímias. O autor apresentou duas chaves dicotômicas para separação de espécies; uma para fêmeas adultas e outra para juvenis. A primeira fundamentada no padrão perineal e caracteres morfológicos outros, tudo em microscopia de luz. A segunda considerando apenas larvas (*sic*) (juvenis). Neste caso, não foi possível separar *Meloidogyne javanica* de *M. ethiopica* havendo dicotomia, portanto, para 21 espécies. De modo organizado, foram apresentadas as descrições específicas, acompanhadas de documentação comprobatória constituída por micrografias, micrometria e fotos dos respectivos padrões perineais. Infelizmente, algumas fotos não apresentaram qualidade suficiente em termos de resolução. A revisão de Whitehead foi publicada na *Transactions of the Zoological Society of London*, com o título: *Taxonomy of Meloidogyne (Nematoda: Heteroderidae) with descriptions of four new species*. A obra

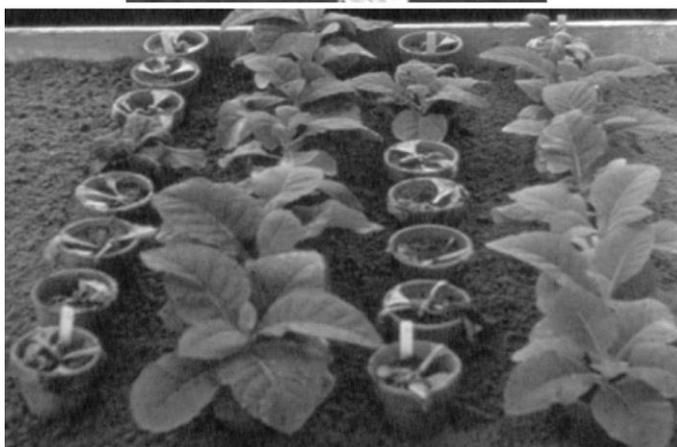
possui 401 páginas contendo textos ilustrados com micrografias e fotos de padrões perineais, tornando-se, na época, a mais completa publicação sobre o nematoide-das-galhas do período Pós-Chitwood. A precisão micrométrica das formas biológicas ilustradas é notável e, por isso, a obra de Whitehead é consultada até hoje. Parte das conclusões do autor, entretanto, já se tornou obsoleta, devido à evolução natural da pesquisa nematológica. Este fato não tira o grande mérito da publicação.

Na década de 1970 a meloidoginose seguiu ganhando importância econômica e fitopatológica, em especial após as pesquisas de N. T. Powell e colaboradores no estado da Carolina do Norte, Estados Unidos. Pesquisador e professor de raro talento, Powell iniciou as suas investigações, quase todas pioneiras, com o que ficou conhecido por doenças do tipo complexo, ou seja, doenças resultantes de uma interação entre dois ou mais agentes fitopatogênicos ou mesmo saprogênicos (*complex diseases*). Foi constatado por meio das suas pesquisas, por exemplo, que o nematoide-das-galhas pode transformar resistência de variedades a outras doenças, especialmente fúngicas e bacterianas, em susceptibilidade (Figura 10). Esse brilhante profissional demonstrou também a importância de organismos soprofiticos no agravamento da síndrome da meloidoginose.

Esser et al. (1976) publicaram: *A diagnostic compendium of the genus Meloidogyne (Nematoda: Heteroderidae)*, trabalho em que foram apresentados dados morfométricos e morfológicos das 35 espécies que os autores consideraram válidas até aquela data. Em detalhes, discutiram os caracteres morfológicos componentes da região perineal e apresentaram micrografias das espécies. Ponte (1977), no Brasil, publicou volumoso catálogo de espécies do nematoide- das-galhas e suas plantas hospedeiras, assinaladas no país. O catálogo continha, além de extensa lista de assinalamentos, pranchas de configurações perineais e relação bibliográfica de significativo valor de consulta (Figura 11).

Ainda em relação aos nematoides-das-galhas, a década dos anos de 1970 se completou com a excelente revisão de Netscher (1978), com o título: *Morphological and physiological variability of Meloidogyne in West Africa and implications for their control*. Em 46 páginas, foram discutidas, além de aspectos históricos, questões relativas à variabilidade, citologia, resistência de plantas ao nematoide etc. Trata-se de matéria de muito boa qualidade, sendo consultada até hoje.

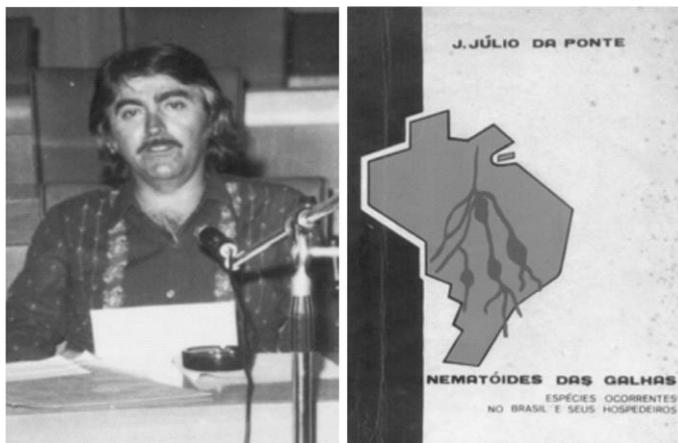
Figura 10. Acima: N. T. Powell, estudioso da susceptibilidade de variedades resistentes a doenças fúngicas e bacterianas, quando parasitadas por *Meloidogyne* spp. Abaixo: plantas saudias de fumo, inoculadas apenas com o fungo *Phytophthora parasitica* f.sp. *nicotianae* e plantas mortas, cultivadas nas mesmas condições, porém inoculadas simultaneamente com o fungo e com *Meloidogyne incognita*, originando síndrome do tipo complexo (*complex disease*).



(Fotos/crédito: acima – NCSU e abaixo - N.T. Powell)

O Método de Chitwood, mesmo recebendo críticas, permaneceu único até a década de 1980, tendo sido de grande utilidade para a agricultura mundial e para as ciências da Fitopatologia e Fitonematologia. Com o método, por exemplo, tornou-se possível relacionar espécies morfológicas do nematoide com espécies botânicas hospedeiras, com relativo grau de acerto. Devido a Chitwood (1949), os programas de rotação de culturas para controle do

Figura 11. J. J. da Ponte, publicou volumoso compêndio (mostrado à direita) sobre assinalamentos da meloidoginose no Brasil, em 1975, com apresentação de novas espécies descritas pelo autor.



(Fotos/crédito: R. M. Moura)

parasito, passaram a ser mais racionais e efetivos. Eventualmente, surgiam casos em que a rotação não era efetiva e, quase sempre, a razão estava relacionada com um diagnóstico impreciso da população de campo. O Método de Chitwood proporcionou também estudos e pesquisas sobre desenvolvimento de cultivares resistentes, em muitas culturas, com significativo grau de acerto, o que pode ser conferido em Milton; Hammons (1975); Sasser; Kirby (1979); Mendonza; Jatala (1985); Starr et al., (2002), entre outros. Diante de tantos fatos positivos, não é possível deixar de reconhecer que o trabalho de Chitwood (1949) foi um marco na evolução do conhecimento do gênero *Meloidogyne* e da meloidoginose. Excetuando-se as variedades, as espécies descritas por Chitwood (1949) permanecem válidas até hoje. O conceito de variedade, termo já evitado por Taylor et al. (1955), que preferiram usar subespécie, teve a sua contestação final quando Triantaphyllou; Sasser (1960) estudaram 14 progênes, cada qual oriunda de única massa de ovos, ou grupo de juvenis, de *Meloidogyne incognita*, de populações coletadas em nove estados dos Estados Unidos. Essas progênes foram multiplicadas em tomateiro por 12 gerações. No final, os autores constataram que a configuração perineal havia segregado, variando do tipo padrão para *Meloidogyne incognita* var. *incognita* à *M. incognita* var. *acrita*. Os autores apresentaram documentação fotográfica convincente e concluíram que essas variações são de ocorrência natural e não justificavam a manutenção da forma *Meloidogyne incognita* var. *acrita*.

Com isto, essa variedade ou subespécie se tornou sinônimo de *Meloidogyne incognita*. Mais tarde, Esser et al., (1976), fundamentados em outros caracteres, deram crédito à denominação “acrita”, criando um novo binômio para uma nova espécie: *Meloidogyne acrita* (Chitwood, 1949) Esser, Perry & Taylor 1976.

SOROLOGIA E CITOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE *MELOIDOGYNE SPP.*

A década de 1960 terminou com uma publicação que trouxe novas esperanças para a taxonomia dos nematoides-das-galhas. Foi o trabalho de Webster; Hooper (1968) no qual os autores preconizaram o emprego da sorologia - técnica bastante conhecida em microbiologia - para comparações analíticas de populações dos fitonematoides *Ditylenchus* e *Heterodera*. Embora o trabalho não tenha envolvido o nematoide-das-galhas, o uso de técnicas sorológicas despertou o interesse de fitonematologistas. Em 1972, Hussey, da *University Georgia (UGA), USA*, publicou pesquisas com esse método na separação de espécies do gênero *Meloidogyne*, Hussey (1972). Segundo esse autor, em informação pessoal, a sorologia não se tornou técnica de uso rotineiro em Fitonematologia por questões de praticidade.

Nematologista e geneticista muito conceituado, A. C. Triantaphyllou com o apoio de colaboradores, liderou as pesquisas citogenéticas com fitonematoides, desde os anos de 1960. Suas metas visavam o conhecimento mais profundo da filogenia da família Heteroderidae e a separação de espécies do gênero *Meloidogyne*, conforme pode ser verificado em Triantaphyllou (1970). Após mais de dez anos de investigações, a citogenética trouxe luz ao conhecimento da genética e evolução dos nematoides-das-galhas, com destaque para a identificação das chamadas “raças citológicas” (TRANTAPHYLLOU, 1985). Esses estudos também proporcionaram melhor compreensão de aspectos evolutivos da família Heteroderidae e dos tipos de reprodução do nematoide-das-galhas, que são: anfimixia (muito raro) e partenogênese, esta dos tipos: mitótica e meiótica. Conquanto as técnicas utilizadas e as determinações citogenéticas não tenham se mostrado efetivas para a separação de espécies do gênero *Meloidogyne*, serviriam, pelo menos, como complemento ao método diagnóstico de Chitwood, que ainda se encontrava em uso rotineiro. Taylor; Netscher (1974) publicaram melhoramentos nas técnicas de preparação de

cortes em fêmeas adultas para observação do padrão perineal, trazendo aumento significativo da praticidade e definição das observações microscópicas, consolidando, ainda mais, o Método de Chitwood.

O INTERNATIONAL MELOIDOGYNE PROJECT (IMP): 1976-1985

Em 1976 teve início o maior programa de pesquisa e extensão já realizado com um único fitopatógeno, com o título: *International Meloidogyne Project* (IMP). A Central de Operações ficou localizada no Departamento de Fitopatologia da *North Carolina State University (NCSU)*, em *Raleigh, NC, USA*. A criação do Programa, responsabilidade de execução e diretrizes gerais ficaram por conta de J. N. Sasser, uma vida dedicada ao estudo e pesquisa do gênero *Meloidogyne* e da meloidoginose. O IMP contou com o suporte financeiro da *Agency for International Development (USAID)* e da *United State Department of Agriculture (USDA)* e teve como justificativa a importância do nematoide-das-galhas em nível mundial e a sua influência negativa na produção de alimentos, especialmente nos países em desenvolvimento. Entre os objetivos considerados prioritários do Programa estava à criação de um método para identificação de espécies do gênero *Meloidogyne*, que seria testado em populações ocorrentes em países de diferentes regiões geográficas. Dois anos após o seu lançamento, em 1978, o IMP patrocinou a publicação do compêndio: *Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (Meloidogyne species)* para uso como ferramenta de trabalho do Programa (TAYLOR; SASSER, 1978). Além de interessantes aspectos biológicos, ecológicos e taxonômicos, foram apresentados nessa obra os caracteres diferenciadores das espécies de *Meloidogyne* ocorrentes em regiões de clima frio e de clima quente. A maioria das informações que foram apresentadas já era conhecida e o compêndio serviu, fundamentalmente, para uniformização metodológica e conceitual dos nematologistas participantes do IMP. Muitos foram trazidos para *Raleigh*, onde se submeteram a treinamentos específicos. Na publicação foram listadas 37 espécies tidas como válidas pelos autores. Cinco dessas espécies haviam sido descritas no Brasil: *Meloidogyne exigua*, (GÖLDI, 1887); *M. inornata*, (LORDELLO, 1956); *M. coffeicola*, (LORDELLO; ZAMITH, 1960); *M. bauruensis*, (LORDELLO, 1956) e *M. lordelloi*, (PONTE, 1969). No fim dos anos setenta, quando o IMP já se aproximava das conclusões dos seus trabalhos, após terem sido atingidos os seus objetivos, dois dos seus

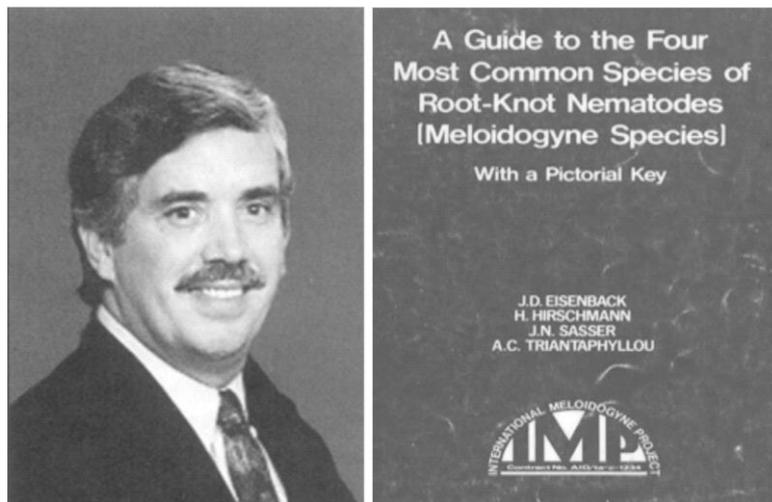
principais pesquisadores publicaram no *Journal of Nematology*, periódico oficial da *Society of Nematologists (SON)*, USA, resultados das suas pesquisas referentes à separação de espécies do gênero *Meloidogyne*, por meio de micrometria e micromorfologia (estruturas observadas com auxílio da microscopia eletrônica de varredura) em juvenis (EISENBACK; HIRSCHMANN, 1979). Mais tarde, estudos semelhantes foram publicados, agora envolvendo formas adultas; machos e fêmeas, por um desses dois autores (HIRSCHMANN, 1985). Segundo esses dois autores, os caracteres morfológicos que foram analisados e propostos para uso na taxonomia do grupo podem ser, com segurança, diferenciadores de espécies e não, simplesmente, complementares do diagnóstico. Essa crítica não pode ser dirigida a Chitwood (1949), pois o seu trabalho foi realizado com microscopia de luz.

É importante serem ressaltados a liderança científica dos estudos de micromorfologia taxonômica realizados pelo *IMP* e os significativos resultados práticos obtidos. Inegavelmente, H. Hirschmann, trabalhando no departamento de Fitopatologia da *NCSU*, foi a grande liderança. Sua prática no uso da microscopia eletrônica de varredura e suas análises micromorfológicas interpretativas e comparativas foram, sem dúvida, extraordinárias (HIRSCHMANN, 1985). J.D. Eisenback (Figura 12), aluno de doutorado da professora Hirschmann, tornou-se destaque do *IMP*. Suas pesquisas foram sempre associadas às de Hirschmann. A participação desses dois pesquisadores foi de total importância para a publicação do manual de identificação das principais espécies do gênero *Meloidogyne* pelo *IMP*; uma obra que marcou época (EISENBACK et al., 1981). Nela, foi apresentado um sistema integrado de métodos diagnósticos para espécies do gênero envolvendo: micrometria, micromorfologia, padrão perineal, reação de plantas hospedeiras, citogenética e testes enzimáticos. O título do manual foi: *A Guide to the Four Most Common Species of Root-knot Nematodes (Meloidogyne Species), With a Pictorial Key* (Figura 12). Os autores se fundamentaram em observações próprias (a maioria) e também em publicações básicas anteriores, como: Eisenback et al. (1980) (microestruturas da região cefálica de fêmeas, estiletos e padrões perineais); Taylor; Sasser (1978) (reações de plantas diferenciadoras); Triantaphyllou (1970) (citogenética) e Dalmasso; Bergé (1978), (taxonomia bioquímica). As metodologias referentes à preparação de espécimes para serem examinados, segundo o manual, foram apresentadas com detalhes em Eisenback, (1985a,

b). A comunidade nematológica mundial considerou o novo protocolo de identificação de espécies como sendo de alta precisão taxonômica, muito embora limitado às quatro espécies mais comuns do gênero, curiosamente as descritas por Chitwood, há 36 anos passados. Entretanto, devido à complexidade metodológica, exigindo operadores especializados, altos custos dos produtos químicos reagentes e dos equipamentos eletrônicos com seus periféricos, o método integrado do *IMP* passou a ser utilizado apenas em laboratórios com mais recursos financeiros e pesquisadores especificamente treinados. Em 1985, o *IMP* condensou e publicou todos os resultados obtidos, ou seja, as novas metodologias e os novos conceitos gerados ao longo dos nove anos de atividade (1976-1985), atuando em países de diferentes continentes. Isto tudo veio em forma de compêndio, com dois volumes, em 1985. O volume I teve por título: *An Advanced Treatise on Meloidogyne; Biology and Control*, editado por J. N. Sasser e C. C. Carter, com 422 páginas (Figura 13). O volume II foi intitulado: *An Advanced Treatise on Meloidogyne; Biology and Control; Methodology*, editado por K. R. Barker, C. C. Carter e J. N. Sasser, com 223 páginas. No volume I, o *IMP* considerou válidas 56 espécies de *Meloidogyne*, algumas de autoria de pesquisadores brasileiros (HIRSCHMANN, 1985). Os dois volumes continuam úteis nos dias de hoje por apresentarem informações básicas sobre o gênero *Meloidogyne*, estatísticas da época, descrições, fotos, protocolos metodológicos e farta bibliografia, referente a diversos temas.

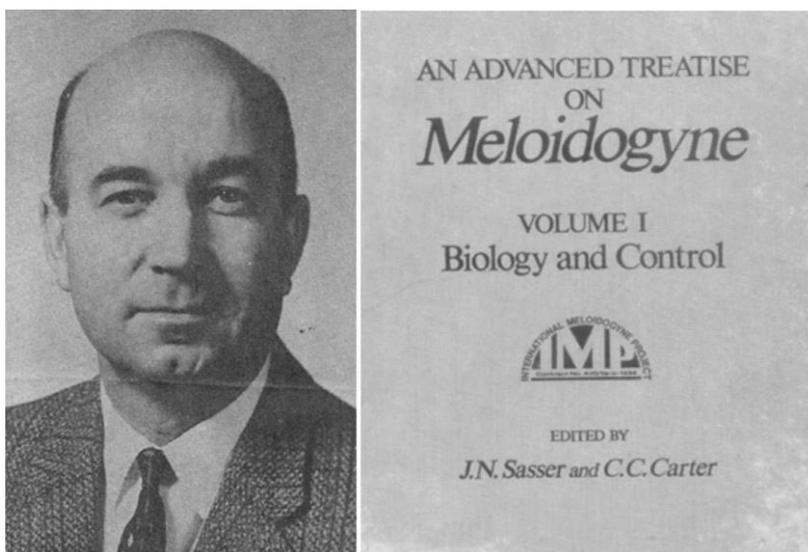
Na Europa, S. B. Jepson foi uma nematologista de destaque entre os que mais contribuíram para o conhecimento taxonômico do nematoide-das-galhas, trabalhando no *Department of Nematology* da *Rothamsted Experimental Station*, em *Harpندن, Herts, United Kingdom (UK)*. No início dos anos 1980 Jepson, (1983a,b,c), publicou observações morfológicas, com microscopia de luz, efetuadas em caudas de juvenis, estruturas cefálicas de machos e estiletos de fêmeas adultas, visando à separação de espécies. Em 1987, reunindo toda experiência pessoal, Jepson publicou uma nova revisão do gênero *Meloidogyne* (JEPSON, 1987) que é considerada até hoje do mais alto valor científico. Foi um trabalho moderno do ponto de vista taxonômico, atualizado conceitualmente para a época, rico em informações, contendo 263 páginas, em seis capítulos. O trabalho trouxe detalhes descritivos extraordinários e farta documentação comprobatória. A dicotomia utilizada para separação das espécies incluiu micrometria, microestruturas e padrões perineais. A autora reconheceu como

Figura 12. À esquerda, J.D. Eisenback um dos principais investigadores do *International Meloidogyne Project* (IMP), que funcionou de 1976 à 1985. À direita, sistema publicado pelo IMP referente à separação de quatro espécies do gênero *Meloidogyne*, com J. D. Eisenback como primeiro autor.



(Fotos/crédito: SON e R.M. Moura, respectivamente)

Figura 13. À esquerda, J. N. Sasser, criador, executor e principal responsável pelo *International Meloidogyne Project* (IMP). À direita, o volume I do conjunto de dois, do compêndio resultante dos trabalhos do IMP.



(Fotos/crédito: SON e R.M. Moura, respectivamente)

válidas 49 espécies, três subespécies (*M. incognita incognita*, *M. incognita grahami* e *M. incognita wartellei*) e apresentou duas novas. As subespécies não foram fundamentadas exclusivamente em variações do padrão perineal, como faziam antigos taxonomistas do grupo.

A partir da década dos anos oitenta a descrição de novas espécies do nematoide-das-galhas diminuiu significativamente. Os novos métodos e conceitos taxonômicos aplicados ao grupo, agora mais rígidos, disciplinaram os *splitters*; sempre ciosos por descrições de novas espécies. Entretanto, com muito critério, novas espécies continuaram a surgir, a exemplo de *Meloidogyne sasseri* (HANDOO et al., 1993), entre outras que viriam mais tarde.

TAXONOMIA MOLECULAR: UMA NOVA ERA NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO NEMATOIDE-DAS-GALHAS

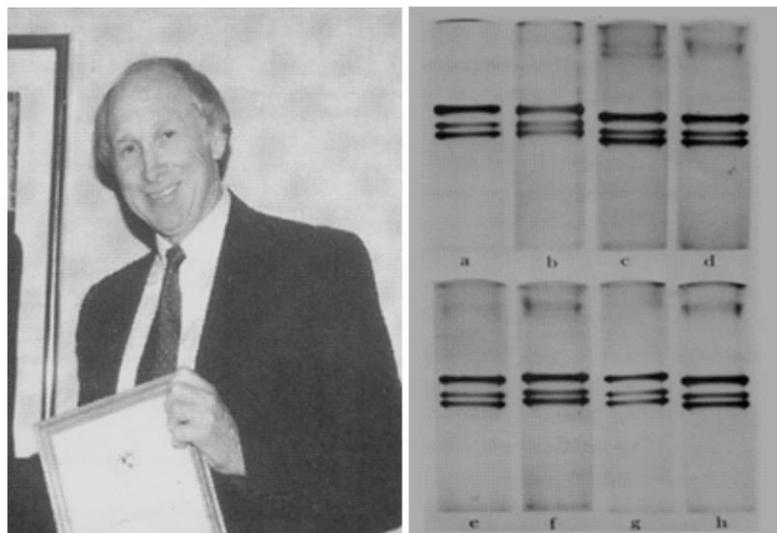
Simultaneamente aos estudos microforfológicos, citogenéticos e sorológicos nos anos 1960 e 1970, eram desenvolvidas pesquisas taxonômicas com fitonematoides para o desenvolvimento de técnicas moleculares objetivando identificações específicas e estudos de filogenia. Era o início do que ficou conhecido por taxonomia química, bioquímica ou molecular, já em uso em outros filós. Esses métodos viriam substituir, não integralmente, a taxonomia morfológica tradicional, ou seja, aquela fundamentada em formas, ausências ou presenças de estruturas e micrometria. Os resultados iniciais básicos foram obtidos por pesquisadores que se dedicavam com afinco a estudos bioquímicos em alguns filós, com objetivos diversos, tais como: composição química (MEYER, 1965) e evolução (GOTTLIEB, 1971). Essas pesquisas deram impulso ao surgimento dos novos sistemas de identificação taxonômica, que evoluíram em todos os reinos. Desde os anos 1960, por exemplo, fungos, bactérias e nematoides, entre outros organismos, tanto de interesse médico, farmacológico ou fitopatológico, foram estudados bioquimicamente (LEE, 1962; LUNN, 1965; BIRD, 1966; MACKO et al., 1967). Naquele tempo, os pesquisadores estavam convencidos de que a constituição química dos organismos e dos seus metabólitos poderiam ser elementos taxonômicos de valor. Dentro desse contexto, no que concerne ao nematoide-das-galhas, D. W. Dickson (Figura 14) e seu orientador de doutorado, que foi concluído na NCSU, J. N. Sasser, publicaram a pesquisa: *Comparative disc-electrophoretic protein analysis of selected Meloidogyne, Ditylenchus,*

Heterodera and Aphelenchus spp., (DICKSON et al, 1970). Essa pesquisa criou uma nova perspectiva para a taxonomia dos nematoides-das-galhas, que necessitava de um sistema de separação de espécies mais simples, mais barata e mais confiável (Figura 14). Embora dúvidas a respeito da nova sistemática tenham sido levantadas (ISHIBASHI, 1970), as pesquisas continuaram e esses mesmos autores publicaram em seguida novos resultados em (DICKSON et al., 1971), em um *paper* intitulado: *Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatase, and esterases for chemotaxonomy of selected Meloidogyne, Ditylenchus, Heterodera and Aphelenchus* spp., no *Journal of Nematology*. O impacto dessa pesquisa foi significativo. Daí, Hussey et al. (1972), ainda trabalhando na NCSU, terem publicado como complemento o trabalho: *Disc eletrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of Meloidogyne incognita and M. arenaria*. Deve-se dizer fazendo-se juz à história, que o alicerce dessa técnica está no trabalho: *Polyacrylamide gel eletrophoresis*, de Chrambach; Rodbard (1971), publicado na *Science*; um dos mais renomados periódicos científicos do mundo. Realmente, ao ser publicado, todos verificaram que se tratava de um procedimento analítico de alta resolução para separação de moléculas de proteínas, com base no tamanho e carga elétrica das mesmas o que geraria alta precisão. Essa foi a razão da sua utilização como padrão na taxonomia de diferentes tipos de organismos, inclusive de fitonematoides. Naquele mesmo ano de 1971, Evans (1971), usando eletroforese em gel de poliacrilamida, em uma pesquisa com nematoides micófitos e fitoparasitos, apresentou resultados taxonômicos muito conclusivos, aumentando a credibilidade do método. Excelente contribuição adicional à credibilidade dessa análise molecular taxonômica foi dada, sem dúvida, por Avise (1974), ao publicar a crônica: *Systematic value of electrophoretic data*, na revista *Systematic Zoology*. As conclusões apresentadas pelo autor, favorecendo à aceitação de novas definições na sistemática zoológica, reafirmaram o valor científico do novo método taxonômico. Esse trabalho trouxe, sobretudo, mais entusiasmo aos pesquisadores. Foi a partir dessas publicações que as pesquisas se intensificaram na busca de um método bioquímico definitivo para identificação das espécies do gênero *Meloidogyne*, que surgiu quatro anos mais tarde. Com efeito, a primeira publicação com densidade metodológica, conceitual e científica, nesse sentido, chegou com o trabalho de Dalmaso; Bergé (1978), com o título: *Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some Meloidogyne spp.: Application to the taxonomy of Meloidogyne*. A grande inovação apresentada foi o uso de macerado de uma

única fêmea adulta na análise (esse fato já havia sido testado com sucesso por Dickson e colaboradores na Carolina do Norte). Os dados foram impactantes. Surgiram discussões em congressos de Nematologia e as primeiras revisões sobre o tema. Nesse sentido, Hussey (1979) publicou uma revisão abrangente, com o título: *Biochemical Systematics of Nematodes: A review*. Nela, foram incluídos muitos dados taxonômicos e detalhada discussão sobre a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, aplicada a diferentes nematoides. Eisenback et al. (1981a), conforme antes mencionado, publicaram, por meio do *IMP*, um manual dicotômico, com descrição individual de espécies do nematoide-das-galhas. O sistema de Eisenback e co-autores foi constituído pela integração de métodos taxonômicos outros e os padrões isoenzimáticos em gel de poliacrilamida.

Na *NCSU*, Triantaphyllou e colaboradores (Figura 15), paralelamente aos seus estudos citogenéticos, vinha desenvolvendo pesquisas em continuidade aos resultados obtidos por Dickson et al. (1970; 1971) e Hussey et al. (1972). Por meio do *IMP*, Esbenshade; Triantaphyllou (1985a, b, c), apresentaram um sumário de suas pesquisas, com detalhes metodológicos e de interpretação, concernentes ao método taxonômico enzimático, em dois capítulos do já mencionado compêndio: *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. O primeiro teve por título: *Identification of major Meloidogyne species employing enzyme phenotypes as differentiating characters* e o segundo: *Electrophoretic methods for the study of root-knot nematodes enzymes*. Resultados práticos surgiram em seguida com Fargette (1987), mostrando a aplicabilidade da nova técnica. Triantaphyllou e colaboradores aplicaram a nova tecnologia taxonômica na identificação de 291 populações das principais espécies do gênero *Meloidogyne*, coletadas em 65 países, de diferentes regiões geográficas do mundo, inclusive do Brasil. Esses resultados foram primeiramente publicados no *Journal of Nematology* (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985c). Os resultados mostraram consistência na relação entre padrões eletroforéticos com a isoenzima esterase, em gel de poliacrilamida, e as descrições morfológicas das espécies mais conhecidas. Essas relações foram verificadas em *Meloidogyne incognita* (98%), *M. javanica* (100%), *M. arenaria* (84%) e *M. hapla* (94%). Cada padrão enzimático passou a ser denominado “fenótipo de esterase”. Chamou atenção inicialmente à espécie *M. arenaria*, que apresentou populações com três diferentes fenótipos de esterase, identificados por letras e números: A1, A2 e A3 (Figura 15). Mais tarde, esse fato seria verificado em outras espécies. Os autores também

Figura 14. D. W. Dickson precursor do uso de técnicas moleculares para separação das principais espécies do gênero *Meloidogyne*. À direita: as bandas (três) obtidas com a isoenzima esterase em gel de ploiacrilamida, relativas à espécie *Meloidogyne arenaria*. Os resultados foram obtidos com homogenatos de indivíduos isolados (uma única fêmea) e de misturas de homogenatos de diferentes indivíduos, oriundos de diferentes populações do nematoide. Ficou constatada alta constância e coerência de resultados taxonômicos para as demais espécies.



(Fotos/crédito: SON e D.W. Dickson, respectivamente)

estudaram padrões obtidos com outras isoenzimas, com destaque para malato desidrogenase (MDH). Entretanto, o fenótipo de esterase passou a ser o padrão principal e o de MDH usado na diferenciação de espécies morfológicas distintas, mas com fenótipos de esterase idênticos, a exemplo de *Meloidogyne naasi* e *M. exigua*. *Meloidogyne incognita* e *M. hapla*, por exemplo, possuem padrões muito semelhantes, com uma só banda, com pequena diferença na mobilidade eletroforética: 47% para *M. incognita* e 49-50% para *M. hapla*; porém, quando verificadas para malato desidrogenase, se mostram absolutamente distintas (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1990). Pesquisas sobre uso de outras técnicas bioquímicas para identificação das espécies do nematoide-das-galhas se desenvolveram paralelamente, com os mesmos objetivos. Curran et al. (1985) relataram observações em DNA para diferenciação de populações do nematoide-das-galhas, com relativo sucesso. Diante da complexidade do tema, das variações conceituais e metodológicas,

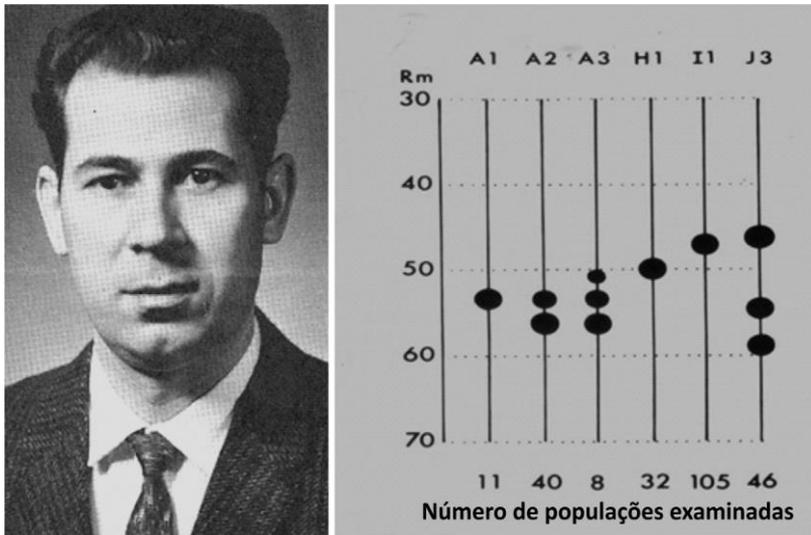
a *Society of Nematologists (SON)* promoveu, em 1989, por ocasião de seu 28º Congresso Anual, em *Davis, Califórnia, USA*, o simpósio: *Biochemical and Molecular Methods of identifying Meloidogyne species*, mediado por R. S. Hussey. Verificou-se grande sucesso nas mesas-redondas. Os mais famosos especialistas da época apresentaram palestras, que foram integralmente publicadas no *Journal of Nematology*, volume 22, do ano 1990. Pesquisas sorológicas foram também discutidas no simpósio em: *Serological differentiation of plant-parasitic nematodes species with polyclonal and monoclonal antibodies* (SCHOTS et al., 1990). Os autores não obtiveram muito sucesso com a técnica, devido ao excesso de reações cruzadas no soro, mas opinaram favoravelmente à progressão das pesquisas. Aparentemente, o pioneiro no uso dessa técnica em Nematologia foi Lee (1965).

Hyman (1990), em seu trabalho *Molecular diagnosis of Meloidogyne species*, tentou relacionar variações dos DNAs nuclear e mitocondrial com espécies e raças de *Meloidogyne*, objetivando desenvolver um novo sistema diagnóstico. O trabalho, rico em técnicas e conceitos, incluiu uma revisão das informações então disponíveis sobre pesquisas com DNA para descrição de fitonematoides. Essa publicação foi apresentada e discutida com sucesso por ocasião do simpósio: *Biochemical and Molecular Methods of Identifying Meloidogyne Species*, da *SON*, anteriormente mencionado. Em 1993, foi publicado um estudo tratando do uso da conhecida técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) na separação de espécies do gênero *Meloidogyne* (POWERS; HARRIS, 1993). Acreditava-se que estudos de DNA e PCR, isoladamente ou associados a outros métodos, poderiam ser de utilidade taxonômica na separação de espécies do nematoide-das-galhas. Estudos neste sentido ainda ocorrem.

A difusão e o aprimoramento das técnicas moleculares aplicadas à Nematologia se intensificaram pelo mundo, fazendo surgir novos estudos e publicações das mais diversas, envolvendo quase todos os tipos de nematoides. A evolução dessas técnicas foge ao escopo desta revisão.

Agora, espécies do nematoide-das-galhas morfológicamente distintas, segundo o sistema de Eisenback et al. (1981), mas com mesmos fenótipos de esterase e de MDH, podem ser consideradas de origem filogenética comum e, portanto, sinonimas. Entretanto, situações taxonômicas conflitantes continuaram a existir. Consultar um especialista nessas situações se faz sempre necessário. Eisenback et al. (1994), diante de uma população atípica em cafeeiro, no Hawaii, descreveram, com muita propriedade, a nova espécie

Figura 15. A.C. Triantaphyllou, em 1985, após estudo de 242 populações, oriundas de diferentes países, de diferentes regiões geográficas, lançou, por meio do *International Meloidogyne Project*, as bases definitivas para o uso rotineiro da taxonomia enzimática dos nematoides das galhas. Legendas: A1; A2; A3= *Meloidogyne arenaria*; H= *M. hapla*; I= *M. incognita* e J= *M. javanica*. Ficou evidente que *M. arenaria* possuía populações com três diferentes fenótipos de esterase.



(Fotos/crédito: SON e R.M. Moura, respectivamente)

Meloidogyne konaensis. Diante de muitas dúvidas surgidas ao longo da pesquisa, os autores fizeram consultas a especialistas, que foram apresentadas na forma de comunicação pessoal na publicação. Este tipo deve ser o procedimento que os taxonomistas devem ter em situações análogas.

Ao fim do século XX, Moura (1996; 1997), no Brasil, escreveu revisões sobre o tema: “O gênero *Meloidogyne* e a Meloidoginose, Partes I e II”, respectivamente, disponibilizando significativa contribuição ao conhecimento do nematoide-das-galhas.

Aparentemente, o último tratado sobre taxonomia dos nematoides-das-galhas, até o momento da conclusão desta revisão, foi o de Hunt; Handoo (2009).

USO DOS TESTES ENZIMÁTICOS NA TAXONOMIA DO NEMATOIDE-DAS-GALHAS NO BRASIL

A aplicação das técnicas moleculares aplicadas à taxonomia

Fitonematológica no Brasil teve início na década de 1990 com Carneiro et al. (1996). Na publicação, pela primeira vez no Brasil, eram relatados estudos taxonômicos envolvendo o nematoide-das-galhas, com o uso de fenótipos de esterase. Mais tarde, veio o trabalho de Alonso; Alfenas (1998), seguindo-se outros congêneres, de diversos autores, sem maiores repercursões. Entretanto, no fim dos anos de 1990, Tenente et al. (1999) publicaram um trabalho que mereceu destaque. Tratava-se de um abrangente manual metodológico intitulado: “Técnicas bioquímicas e moleculares na diagnose de fitonematoides”, de grande utilidade prática, sendo excelente para consultas por pesquisadores e estudantes. Ainda sobre o tópico, Carneiro; Almeida (2001) publicaram, didaticamente, a descrição do método enzimático aplicado à taxonomia dos nematoides-das-galhas. Fundamentando-se nos novos conceitos e métodos, essa pesquisadora foi responsável por descrições de novas espécies e estabelecimento de sinônimas, como em Carneiro et al. (1996; 2005; 2008).

Regina M. D. G. Carneiro no Brasil, atuando quase sempre com colaboradores, tornou-se a líder nacional na área da taxonomia molecular, especialmente a enzimática, relativamente aos nematoide-das-galhas. Efetuou e colaborou com levantamentos populacionais no país e exterior, a exemplo de Castro et al. (2003) e Carneiro et al. (2005). Com suas pesquisas, que contam sempre com a presença de colaboradores, essa pesquisadora vem prestando grande colaboração à Nematologia brasileira, especialmente em relação à cultura do cafeeiro (CARNEIRO et al., 2004; CARNEIRO et al., 2005). Foi também Carneiro responsável pelo treinamento de novos pesquisadores taxonomistas-moleculares, que atualmente praticam e disseminam os conhecimentos adquiridos; como Lordello, Carneiro fez escola no Brasil.

Cordeiro et al. (2008) publicaram “Identificação molecular do nematoide das galhas, *Meloidogyne* spp.” Além de importantes resultados de estudos próprios, os autores mostraram, sobretudo, a complexidade do processo da evolução do método de identificação de espécies por vias moleculares, o que foge, conforme dito, do escopo desta modesta revisão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dificuldades metodológicas e conceituais relativas à taxonomia do nematoide-das-galhas persistem, em particular na conceituação de espécies.

Esbenshade; Triantaphyllou (1985a) afirmaram o que ainda é válido nos dias de hoje, “*precise and reliable identification of species is a formidable task even for well-qualified taxonomists with expertise in the genus Meloidogyne*”.

Mais tarde, justificando a complexidade do tema, Esbenshade; Triantaphyllou (1990) afirmaram que, após o estudo de 600 populações, oriundas de diferentes regiões do mundo, ficou definitivamente evidenciado que *Meloidogyne* spp. não são espécies biológicas verdadeiras, pelo contrário, representam formas predominantemente partenogênicas, derivadas ao longo de diferentes linhas de evolução. Além do mais, essas “ditas” espécies possuem variações no tipo de reprodução, indo da anfimixia à partenogênese, facultativa ou obrigatória, e com ploidias diversas, ocorrendo formas haploides a poliploides, com 14 a 74 cromossomos.

Excelente descrição de uma nova espécie, *Meloidogyne morocciensis*, com deslocamento de forma taxonômica próxima, pode ser observada em Rammah; Hirschman (1990). Essa publicação pode servir de modelo para descrição de novas espécies do grupo, de acordo com a conceituação mais atual.

Um fato curioso é que as novas técnicas taxonômicas e as diversas revisões do gênero *Meloidogyne*, efetuadas ao longo de décadas, por consagrados autores, não invalidaram as espécies descritas por Chitwood (1949), exceto as “variedades” *incognita* e *acrita* de *M. incognita*. As pesquisas apenas confirmaram as suas identidades. Curiosamente também, essas espécies são as que mais ocorrem no mundo, as mais estudadas e as de maior importância econômica (PONTE; CASTRO, 1975; NETSCHER, 1978; SASSER, 1980; JEPSON, 1987; MOURA et al., 2000; CARNEIRO et al., 2005.) Segundo Carter; Sasser (1985), após o levantamento mundial feito pelo IMP, ficou constatado que as espécies descritas por Chitwood (1949) - *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* - respondem por 95% das ocorrências do nematoide-das-galhas em solos agrícolas. Ressaltando esse último fato, é aqui enaltecida a memória de B. G. Chitwood, um dos maiores nomes da Zoologia de Invertebrados de todos os tempo; um gênio, muitas vezes incompreendido e invejado. A Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN) não o esqueceu e prestou-lhe uma homenagem simples, mas significativa, em Moura (1997).

Finalmente, homenagens devem ser prestadas a *North Carolina State University* pela contribuição ao conhecimento da Nematologia das Plantas e, em especial, dos nematoídes-das-galhas. Em relação às ciências agrárias, além

de gerar novos conhecimentos, sempre visando o agricultor, formou muitos novos cientistas. O grupo de docentes nematologistas sempre foi destaque atuando no departamento de Fitopatologia. Destaque pela produção científica e formação de novos pesquisadores (Figura 16).

Figura 16. A *North Carolina State University* (NCSU) liderou o mais famoso programa de pesquisas sobre o nematoides-das-galhas; o *International Meloidogyne Project* (IMP). Além de ter gerado um grande volume de novos conhecimentos científicos nematológicos, a NCSU formou muitos novos nematologistas, ao nível de PhD. Os mostrados na foto participaram ativamente do IMP. Da esquerda para a direita vêm-se: R.D. Riggs, D. W. Dickson; P.S. Lehman; R.M. Moura; J.G. Baldwin, J. D. Eisenback e C. Opperman.



(Foto/crédito: R.M. Moura)

AGRADECIMENTOS

O autor é grato (*in memoriam*) ao doutor Nathan Thomas Powell, inesquecível orientador de PhD na NCSU e aos professores e amigos Joseph Neal Sasser (*in memoriam*) e Richard S. Hussey pelas oportunidades de interação profissional e consultas bibliográficas em seus acervos pessoais. Igualmente é grato ao Dr. Luiz Carlos Ferraz pela leitura crítica deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, S. K.; ALFENAS, A. C. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fitonematoides. Em: ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**, fundamentos e aplicações práticas. Viçosa, UFV, 525-543, 1998.
- ATKINSON, G. F. A preliminary report upon the life history and metamorphosis of a root-gall nematode, *Heterodera radicola* (Greef) Müller, and the injuries caused by it upon the roots of various plants. **Sci. Contr. Agric. Exp. Sta. Alabama Polyt. Inst.**, 1: 177-226, 1889.
- AVISE, J. C. Systematic value of electrophoretic data. **Systematic Zoology**, 23: 465-481, 1974.
- BERKELEY, M. J. Vibrio forming cysts on the root of cucumbers plants. **Garden Chronics**, 14: 220, 1855.
- BIRD, A. F. Esterases in the genus *Meloidogyne*. **Nematologica**, 12:359-361, 1966.
- BRITISH MYCOLOGICAL SOCIETY & AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. **Phytopathological Classics (APS)** n° 8. 1948.
- BYARS, L. P. Preliminary notes on the cultivation of the plant-parasitic nematode *Heterodera radicola*. **Phytopathology**, 4: 323-326, 1914.
- CARNEIRO, R. D. M. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematol. Brasileira**, 25: 35-44, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G., ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, 19: 555-560, 1996.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; GOMES, A. C. M. M.; HERNÁNDEZ, A. *Meloidogyne izalcoensis* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising coffee in El Salvador. **Nematology**, 7: 819-832, 2005.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDING, O.; ALMEIDA, M. R. A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex PCR. **Nematol. Brasileira**, 29: 233-242, 2005.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; TIGANO, M. S.; RANDIG, O., ALMEIDA, M. R. A.; SARAH, J. L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, 6: 287-298, 2004.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; MENDES, M. L.; ALMEIDA, M. R. A.; SANTOS, M. F. A.; GOMES, A. C. M. M.; KARSSSEN, G.. Additional information on *Meloidogyne inornata* Lordello, 1956 (Tylenchida: Meloidogynidae) and its characterisation as a valid species. **Nematology**, 10: 123-136, 2008.

- CARTER, C. C.; SASSER, J. N. **Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) affecting economic food crops in developing Nations**. International *Meloidogyne* Project, NCSU/ USAID, North Carolina State University Graphics, 1982.
- CASTRO, J. M. C.; LIMA, R. D.; CARNEIRO, R. M. D. G. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. **Nematol. Brasileira**, 27: 1-12, 2003.
- CHITWOOD, B. G. Root-knot nematodes: Part 1. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. **Proc. Helminthol. Soc. Wash.**, 16: 90-104, 1949.
- CHITWOOD, B. G.; SPECHT, A. W.; HAVIS, L. Root-knot nematodes: Part 3. Effects of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on some peach rootstocks. **Plant & Soil**, 4:77-95, 1952.
- CHITWOOD, B. G.; HANNON, C. I.; ESSER, R.P. A new nematode genus, *Meloidodera*, linking the genera *Heterodera* and *Meloidogyne*. **Phytopathology**, 46: 264-266, 1956.
- CHRAMBACH, A.; RODBARD, D. Polyacrylamide gel electrophoresis. **Science**, 172: 440-451, 1971.
- CHRISTIE, J. R.; ALBIN, F. R. Host-parasite relationships of the root-knot nematode, *Heterodera marioni*: 1- The question of races. **Proc. Helminthol. Soc. Wash.**, 11: 31-37, 1944.
- CHRISTIE, J. R.; HAVIS, L. Relative susceptibility of certain peach stocks to races of the root-knot nematode. **Plant Disease Reporter**, 32: 510-514, 1948.
- COBB, N. A. The amphids of *Caconema* (nom. nov.) and other nemas. **J. Parasitology**, 11:118-120, 1924.
- COBB, N. A. *Tylenchus* and root-gall. **Agric. Gaz. N.S.W.**, 1: 155-184, 1890.
- COETZEE, V. *Meloidogyne acronea*, a new species of root-knot nematode. **Nature**, 177: 889-900, 1956.
- CORDEIRO, M.C.R.; GOULART, A.M.C.; SHARMA, R.D. **Identificação molecular de nematoide das galhas**. Embrapa, Cerrado, MAPA. 2008.
- CORNU, M. Études sur le *Phylloxera vastatrix*. **Mém. Acad. Sci., Paris**, 26: 163-175, 1879 a.
- CORNU, M. Sur une maladie qui fait périr lês rubiacées dès serres chaudes (*Anguillules*). **C.R. Acad. Sci., Paris**, 88: 668, 1879 b.
- CURRAN, J.; BAILLIE, D.L.; WEBSTER, J.M. Use of genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. **Parasitology**, 90:137-144, 1985.
- DALMASSO, A.; BERGÉ, J. B. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. **J. Nematol**, 10: 323-332, 1978.
- DAY, L. H.; TUFTS, W. P. Further notes on nematode-resistant rootstocks for deciduous fruit tree. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 37: 327-329, 1940.

DICKSON, D. W.; HUISINGH, D.; SASSER, J.N. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. **J. Nematol.**, 3: 1-16, 1971.

DICKSON, D. W.; SASSER J. N.; HUISINGH, D. Comparative disc-electrophoretic protein analysis of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, and *Aphelenchus* spp. **J. Nematol.**, 2: 286-293, 1970.

EISENBACK, J. D. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Em: SASSER, J. N. & CARTER, C. C. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol.1. Biology and Control. IMP, **North Carolina State University Graphics**, 95-112, 1985 a.

EISENBACK, J. D. Morphological comparison of head shape and stylet morphology of second-stage juveniles of *Meloidogyne* species. **J. Nematol.**, 14: 339-343, 1982.

EISENBACK, J. D. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. Em: BARKER, K. R., CARTER, C. C. & SASSER, J. N. Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol. 2. Methodology. IMP, **North Carolina State University Graphics**, 79-105, 1985 b.

EISENBACK, J. D.; HIRSCHMANN, H. Morphological comparison of second-stage juveniles of several *Meloidogyne* species (root-knot nematodes) by scanning electron microscopy. **Scan. Elect. Microscopy**, 3: 223-229, 1979.

EISENBACK, J. D.; BERNARD, E. C.; SCHMITT, D. P. Description of the Kona coffee root-knot nematode, *Meloidogyne konaensis* n. sp. **J. Nematol.**, 26: 363-374, 1994.

EISENBACK, J. D.; HIRSCHMANN, H.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Morphological comparison of *Meloidogyne* female head structures, perineal patterns and stylets. **J. Nematol.**, 12:300-313, 1980.

EISENBACK, J. D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J. N.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. **A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**, with a pictorial key. International *Meloidogyne* Project. The Dept. Plant Pathology and Genetics, NCSU/ USAID., USA. 1981.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematodes enzymes. Em: BARKER, K. R., CARTER, C. C. & SASSER, J. N. **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***. Vol.2. Methodology. IMP, North Carolina State University Graphics, 115-123, 1985 c.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Enzyme phenotypes in *Meloidogyne* identification. Em: SASSER, J. N. & CARTER, C. C. **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***. Vol.1. Biology and Control. IMP, North Carolina State University Graphics, 135-140, 1985 b.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Isoenzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **J. Nematol.**, 22: 10-15, 1990.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. **J. Nematol.**, 17: 6-20, 1985 a.

- ESSER, R. P., PERRY, V. G.; TAYLOR, A. L. A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). **Proc. Helminthol. Soc. Wash.**, 43:138-150, 1976.
- EVANS, A. A. F. Taxonomic value of gel-electrophoresis of proteins from mycophagous and plant-parasitic nematodes. **Int. J. Biochem.**, 2: 72-79, 1971.
- FARGETTTE, M. Use of esterase phenotypes in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. II. Esterase phenotypes observed in West African populations and their characterisation. **Revue Nématol.**, 10: 45-56, 1987.
- FILIPJEV, I. N. On the classification of the Tylenchinae. **Proc. Helminthol. Soc. Wash.**, 3: 80-82, 1936.
- FRANKLIN, M. T. A British root-knot nematode, *Meloidogyne artiellia* n. sp. **J. Helminthol.** (Suppl), 85-92, 1961.
- FRANKLIN, M. T. A root-knot nematode, *Meloidogyne naasi* n.sp., on field crops in England and Wales. **Nematologica**, 11: 79-86, 1965.
- FRANKLIN, M. T. Review of the genus *Meloidogyne*. **Nematologica**, 2 (Suppl.): 387-397, 1957.
- GÖLDI, E. A. Relatório Sobre a Moléstia do Cafeeiro na Província do Rio de Janeiro. **Arch. Mus. Nac.**, 8: 7-123, 1887.
- GOODEY, T. On the nomenclature of the root-gall nematodes. **J. Helminthol.**, 10: 21-28, 1932 a.
- GOODEY, T. **Plant Parasitic Nematodes and The Diseases They Cause**. E. P. Dutton & Company Inc., New York, 1932 b.
- GOTTLIEB, L. D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, 21: 939-944, 1971.
- GREEFF, R. Ueber Nematoden in Wurzelanschwellungen (Gallen) verschiedener Pflanzen. **Sber. Ges. Beförd. Ges. Naturw.**, 11: 172-174, 1872.
- HANDOO, Z. A.; HUETTEL, R. N.; GOLDEN, A. M. Description and SEM observations of *Meloidogyne sasseri* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae) parasitizing beachgrasses. **J. Nematol.**, 25: 628-641, 1993.
- HARTMANN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential hosts test and perineal-parttern morphology. Em: BARKER, K. R., CARTER, C. C.; SASSER, J. N. **An Advanced Treatise on Meloidogyne**. Vol. 2. Methodology. IMP, North Carolina State University Graphics, 69-77, 1985.
- HIRSCHMANN, H. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. Em: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An Advanced Treatise on Meloidogyne**. Vol. 1. Biology and Control. IMP, North Carolina State University Graphics, 79-93, 1985.

- HUNT, D.J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. Em: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Eds). **Root-Knot Nematodes**. CABI, Wallingford, 2009.
- HUSSEY, R. S. Serological relationships of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **J. Nematol.**, 3: 101-104, 1972.
- HUSSEY, R. S. Biochemical Systematic of Nematodes - A Review. **Helm. Abstr., Series B**, 48: 141-148, 1979.
- HUSSEY, R. S.; SASSER, J. N.; HUISINGH D. Disc electrophoretic studies of soluble protein and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **J. Nematol.**, 4: 183-189, 1972.
- HYMAN, B. Molecular diagnosis of *Meloidogyne* species. **J. Nematol.**, 22: 24-30, 1990.
- ISHIBASHI, N. Variations of the electrophoretic protein patterns of Heteroderidae (Nematoda: Tylenchida) depending on the developmental stages of the nematode and on the growing conditions of the host plants. **Appl. Entomology Zool.**, 5: 23-32, 1970.
- JOBERT, M. C. Sur une maladie du caféier observée au Brésil. **C.R. Acad. Sci., Paris**, 87: 941-943, 1878.
- JEPSON, S. B. Identification of *Meloidogyne*: a general assessment and a comparison of male morphology using light microscopy with a key to 24 species. **Rev. Nématologie**, 6: 291-309, 1983 a.
- JEPSON, S. B. Identification of *Meloidogyne* species: a comparison of stylets of females. **Nematologica**, 29: 132-143, 1983 b.
- JEPSON, S. B. **Identification of root-knot nematodes** (*Meloidogyne* species). CAB, Wallingford. 1987.
- JEPSON, S. B. The use of second-stage juvenile tails as an aid in the identification of *Meloidogyne* species. **Nematologica**, 29: 11-28, 1983 c.
- KOFOID, C. A.; WHITE, W. A. A new nematode infection in man. **J. Amer. Med. Assoc.**, 72: 567-569, 1919.
- LAVERGNE, G. La *Anguillula* en Sud-America. **Revta. Chil. Hist. Nat.**, 5: 85-91, 1901 a.
- LAVERGNE, G. L'anguillule du Chili (*Anguillula vialae*). **Revue Vitic.**, 16: 445-452, 1901 b.
- LEE, D. L. The distribution of esterase enzymes in *Ascaris lumbricoides*. **Parasitology**, 52: 241-260, 1962.
- LEE, S. H. Attempts to use immunodiffusion for species identification of *Meloidogyne*. **Nematologica**, 11: 41, 1965 (Abst.)
- LICOPOLI, G. Sopra alcuni tubercoli radicellari continente anguillole. **Rc. Accad. Sci. Fiz. Napoli**, 14: 41-42, 1875.
- LOOS, C. A. *Meloidogyne brevicauda* n. sp., a cause of root-knot of mature tea in Ceylon. **Proc. Helm. Soc. Wash.**, 20: 83-91, 1953.

- LORDELLO, L. G. E.; ZAMITH, A. P. L. *Meloidogyne coffeicola*, sp. n., a pest of coffee trees in the state of Paraná, Brazil. **Rev. Bras. Biol.**, 20: 375-379, 1960.
- LORDELLO, L. G. E. *Meloidogyne inornata* sp. n. a serious pest of soybean in the State of São Paulo. **Rev. Bras. Biol.**, 16: 65-70, 1956.
- LUNN, B. M. A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group of *D. streptococci*. **J. Gen. Microbiology**, 40: 413-419, 1965.
- MACKO, V.; NOVACKY, A.; STAHMANN, M. A. Protein and enzyme patterns from urediospores of *Puccinia graminis* v. *tritici*. **Phytopathology**, 58: 122-127, 1967.
- MENDOZA, H. A.; JATALA, P. Breeding potato for resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne* species. Em: SASSER, J. N & CARTER, C. C. **An Advanced Treatise on Meloidogyne**. Vol. 1. Biology and Control. IMP, North Carolina State University Graphics, 217-231, 1985.
- MEYER, R. F. Amylase, cellulase, invertase and pectinase in several free-living, mycophagous and plant-parasitic nematodes. **Nematologica**, 11: 441-448, 1965.
- MILTON, N. A.; HAMMONS, R. O. Evaluation of peanut for resistance to the peanut nematode, *Meloidogyne arenaria*. **Plant Dis. Repr.**, 59: 944, 1975.
- MOURA, R. M. Identificação de espécie de *Meloidogyne* causadora de galhas em figueira, através das suas características morfológicas e reações induzidas em plantas diferenciadoras. **Summa Phytopathol.**, 2: 157-164, 1976.
- MOURA, R. M. O gênero *Meloidogyne* e a *Meloidoginose*. Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas. **Ed. Passo Fundo, SBF**, 4: 209-244, 1996.
- MOURA, R. M. O gênero *Meloidogyne* e a *Meloidoginose*. Parte II. Revisão Anual de Patologia de Plantas. **Ed. Passo Fundo, SBF**, 5: 281-315, 1997.
- MOURA, R. M. **Relatório sobre a Moléstia do Cafeeiro na Província do Rio de Janeiro** (reedição do original por E. A. Göldi, 1887). Faturpe/UFRPE, Recife, PE, 1998.
- MOURA, R. M. Uma homenagem ao Dr. Benjamin Goodwin Chitwood. **Nematol. Brasileira**, 21: 31-38, 1997.
- MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; MACEDO, M. E. A.; MOURA, A. M.; SILVA, E. G.; LIMA, R. F. Ocorrência dos nematoides *Pratylenchus zaeae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste brasileiro. **Fitopatol. Brasileira** (atual Tropical Plant Disease), 25: 101-103, 2000.
- MÜLLER, C. Mitteilungen über die unseren Kulturpflanzen schädlichen das Geschlecht *Heterodera* bildenden Würmer. **Landw. Jahrb.**, 13: 1-42, 1884.
- NEAL, J. C. The root-knot disease of the peach, orange and other plants in Florida, due to the work of the *Anguillula*. **Bull. U.S. Bur. Ent.**, 20: 1-31, 1889.
- NETSCHER, C. Morphological and physiological variability of species of *Meloidogyne* in West Africa and implication for their control. **Meded. Landbouwhogesch. Wageningen**, 78-83, 1978.

- PAYAN, L. A.; DICKSON, D. W. Comparison of populations of *Pratylenchus brachyurus* based on isoenzyme phenotypes. **J. Nematol.**, 22: 538-545, 1990.
- PONTE, J. J. DA. *Meloidogyne lordelloi* sp. n., a nematode parasite of *Cereus macrogonus* Salm-Dick. **Bol. Cear. Agronomia**, 10: 50-61, 1969.
- PONTE, J. J. DA. Nematóides das Galhas: Espécies ocorrentes no Brasil e seus hospedeiros. **Col. Mossoroense**, ESAM, 1977.
- PONTE, J. J. DA.; CASTRO, F. E. Lista adicional de plantas hospedeiras de nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp. no estado do Ceará (Brasil). **Fitossanidade**, 1: 29-30, 1975.
- POWERS, T. O.; HARRIS, T. S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. **J. Nematol.**, 25: 1-6, 1993.
- RAMMAH, A.; HIRSCHMANN, H. *Meloidogyne morocciensis* n. sp. (Meloidogy-ninae), a root-knot nematode from Morocco. **J. Nematol.**, 22:279-291, 1990.
- REYNOLDS, H. W. Relative degree of infection of American-Egyptian and upland cotton by three populations of the root-knot nematode. **Plant. Dis. Repr.**, 33: 306-309, 1949.
- SANDGROUND, J. A study on the life-history and methods of control of the root-gall *Heterodera radiculicola* (Greeff) Müller in South Africa. **South. Afr. J. Sci.**, 18: 399-418, 1922.
- SANDGROUND, J. "*Oxyuris incognito*" or *Heterodera radiculicola* ? **J. Parasitol.**, 10: 92-94, 1924.
- SASSER, J. N. Identification and host-parasite relationships of certain root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Univ. of Maryland Agr. Exp. Sta. Bull.**, A-77: 1-31, 1954.
- SASSER, J. N. Root-knot nematodes; a global menace to crop production. **Plant Disease**, 64: 36-41, 1980.
- SASSER, J. N.; CARTER, C. C. Overview of the International *Meloidogyne* Project 1975-1984. Em: SASSER, J. N. & CARTER, C. C. **An Advanced Treatise on Meloidogyne**. Vol. 1. Biology and Control. IMP, North Carolina State University Graphics, 19-24, 1985.
- SASSER, J. N.; KIRBY, M. F. **Crop cultivars resistant to root-knot nematodes**, *Meloidogyne* species with information on seed sources. Department of Plant Pathology, NCSU/USAID, 1979.
- SCHACHT, H. Ueber einige Feinde und Krankheiten der Zuckerrübe. **Zeitschr. Ver. Rübenzucker-Ind. Zoolver**, 9: 390, 1859.
- SCHMIDT, A. Ueber den Rüben-Nematoden (*Heterodera schachtii* A.S.). **Zeitschr. Ver. Rübenzucker-Ind. Zoolver**, 21: 1-19, 1871.
- SCHOTS, A.; GOMMERS, F. J.; BAKKER; J. EGBERTS, E. Serological differentiation of plant-parasitic nematode species with polyclonal and monoclonal antibodies. **J. Nematol.**, 22: 16-23, 1990.
- SHERBAKOFF, C. D. Recent field observations on tomato and cotton root-knot nematodes. **Plant Dis. Repr.** (Suppl), 124: 146, 1940.

- SLEDGE, E. B.; GOLDEN, A. M. *Hypsoperine graminis* (Nemata: Heteroderidae) a new genus and species of plant-parasitic nematode. **Proc. Helm. Soc. Wash.**; 31: 83-88, 1964.
- STARR, J. L. **Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes**. The Society of Nematologists (SON), Hyattsville, 1990.
- STRUBELL, A. Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung des Rüben-Nematoden, *Heterodera schachtii* Schmidt. **Bibliotheca Zool.**, 2: 1-52, 1888.
- STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. CABI, Wallingford. 2002.
- TAYLOR, D. P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, 20: 268-269, 1974.
- TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes** (*Meloidogyne* species). International *Meloidogyne* Project. North Carolina State University Graphics, 1978.
- TAYLOR, A. L.; DROPKIN, V. H.; MARTIN, G. C. Perineal patterns of root-knot nematodes. **Phytopathology**, 45: 26-34, 1955.
- TENENTE, R. C. V.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M. Técnicas bioquímicas e moleculares na diagnose de fitonematoides. **Boletim de Pesquisa nº 6. Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1999.
- THORNE, G. **Principles of Nematology**. McGraw-Hill, London, 1961.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. Cytogenetic aspects of evolution of the family Heteroderidae. **J. Nematol.**, 2: 26-32, 1970.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. Em: SASSER, J.N & CARTER, C. C. **An Advanced Treatise on Meloidogyne**. Vol. 1. Biology and Control. IMP, North Carolina State University Graphics, 113-126, 1985.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. Polyploidy and reproductive patterns in the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. **J. Morphology**, 118: 403-441, 1966.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C.; SASSER, J.N. Variation in perineal patterns and host specificity of *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology**, 50: 724-735, 1960.
- TREUB, M. Onderzoekingen over sereh-ziek suikerriet. **Meded. Uit's Plantentuin**, Java, 2: 1-39, 1885.
- TYLER, J. Reproduction without males in aseptic root cultures of the root-knot nematode. **Hilgardia**, 10: 373-388, 1933.
- WEBSTER, J. M.; HOOPER, D. J. Serological and morphological studies on the inter and intraspecific differences of plant-parasitic nematodes *Heterodera* and *Ditylenchus*. **Parasitology**, 58: 879-891, 1968.
- WHITEHEAD, A. G. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) with descriptions of four new species. **Trans. Zool. Soc. London**, 31: 263-401, 1968.