

# КЛАСИЧНИ И СОВРЕМЕНИ МЕТОДИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА НЕМАТОДИТЕ ОД РОДОТ MELOIDOGYNE

Македонка Даутова\*, Филип Пејчиновски\*\*

## КРАТОК ИЗВАДОК

Прецизната идентификација на фитопаразитните нематоди е фундамент за успешна ерадикација на истите особено при примена на контролни мерки кои не се базираат на употреба на нематоциди. Определување на квалитативниот и квантитативниот состав на галовите нематоди во 11 испитувани локации во Македонија со примена на класични и современи методи на идентификација беше предмет на испитување на овој научен труд. Употребата на класичните методи за идентификација не ни овозможуваат определување на видот врз основа на морфологија на инвазионите и презимувачки стадиуми на нематодите (L<sub>2</sub> или јајце), додека со помош на PCR методот единечна ларва (или јајце) беше доволно за да се определи видот на Meloidogyne застапен во испитуваниот локалитет. Сите испитувани изолати припаѓаа на четирите агрономско најважни видови во светот: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* и *M. hapla*.

**Клучни зборови:** Meloidogyne, идентификација, морфологија, PCR, оранжери, тутун.

## CLASICAL AND CONTEMPORARY METHODS FOR IDENTIFICATION OF THE ROOT KNOT NEMATODES, MELOIDOGYNE

### SUMMARY

Accurate identification of plant-parasitic nematodes is the foundation for successful nematode eradication especially nematode management that does not rely on nematocides. Qualitative and quantitative determination of the composition of root-knot nematodes, Meloidogyne spp., from 11 locations in Macedonia, applying classical and contemporary methods for identification, was the object of research in this project.

The classical methods for identification do not give us an opportunity to identify the infective and overwintering stages of the nematode species (L<sub>2</sub> and Egg). Highly sensitive techniques, based on PCR, enabled us to identify single Meloidogyne eggs and individual second stage juveniles. Each determined isolate was identified as one of the four most agronomically important Meloidogyne species in the world: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. hapla*.

**Key words:** Meloidogyne spp., identification, morphology, PCR, glasshouses, tobacco.

---

\* М-р Македонка Даутова, ИРЕ Институт за Земјоделство, 92400 Струмица, МК

\*\* Д-р Филип Пејчиновски, Земјоделски факултет, 91000 Скопје, МК

\* MSc Makedonka Dautova, IRE Institute of Agriculture, 92400 Strumica, MCD

\*\* Dr Filip Pejcinovski, Faculty of Agriculture, 91000 Skopje, MCD

## ВОВЕД

Идентификацијата на *Meloidogyne* (галови нематоди) е тешка поради тоа што: 1. до денес се опишани над 60 видови и 2. нивните релативно мали димензии и често идентични или многу слични морфолошки карактеристики. Денес постојат околу 150 таксономски карактеристики кои се користат за идентификација на *Meloidogyne* spp.: морфолошки, биохемиски, цитолошки, молекуларни и. т. н.

Класичните методи за идентификација главно се базират на определување на морфолошки и морфометрички карактеристики на различни развојни стадиуми на нематодите. Морфологијата на адултна женка е најважната карактеристика користена за идентификација на видовите од родот *Meloidogyne* (25, 22). Така рутинските техники за идентификација на *Meloidogyne* spp. во минатото се базирале главно на разликите во периналното поле (11). Научниците бргу утврдиле дека и периналното поле е доста вариабилно, и многу аберантни и интермедиарни форми биле најдени (1, 10, 20, 24). Whitehead (1968) утврдил дека со рапидното зголемување на бројот на новоопишани видови, станало се потешко да идентификацијата се изврши само врз основа на периналното поле. Тој ја ре-емфазирал морфологијата и морфометриката на  $L_2$  и мажјаците и снабдел со значајни информации за многу видови, нагласувајќи ги разликите помеѓу нив. Сепак периналното поле останало најважниот карактер, а морфологијата на  $L_2$  и мажјаците биле корисни само како дополнителни карактери. Некои испитувачи нашле дека овие дополнителни карактери на ларвите и мажјаците се корисни (12, 22) додека други дека не се (19). Морфологијата на главата на женка и стилетот не добиле важност. Дури и кога Chitwood (1949) укажал на разликите во морфологијата на стилетот кај женките, неговата таксономска вредност не била документирана. Должината на стилетот и растојанието од отворот на дорзалната жлезда до основата на стилетниот јазел се единствените карактери употребувани од таксономистите. Одредувањето на морфолошките карактеристики како таксономски маркери за идентификација одсекогаш барало доста време и било проблематични поради потребата од специализиран кадар.

Само врз основа на морфолошките карактеристики на ларви (или јајца), кои претставуваат инвазии и презимувачки стадиуми на многу нематодни видови (13), не е можно да се определи видот на нематодите. Ларвените стадиуми од фитопаразитните нематоди се тешки за идентификација поради нивните мали димензии и недостиг на јасно разликувачки морфолошки карактеристики. Фактот дека почвата пред садење содржи само ларви или јајца, ја наметнува неопходноста од одгледување на нематодите во оранжериски култури за да се произведат адултни женки кои би послужеле за идентификација.

Непосредна цел на современите техники во нематологијата е да ја зголемат прецизноста и брзината на видовата идентификација (27). Употребата на молекуларни маркери за идентификација на видовите нематоди ја зголемуваат детекционата осетливост во примерокот, која е важна за регулирачки цели, и евентуално би ја зголемила брзината на квантифицирање на нематодните видови детектирани во испитуваниот примерок. Во многу случаи потребно е да се идентификува присуство на мал број ларви во комплексна мешавина од видови. Ова е овозможено со методи кои се базираат на т.н. полимеразната

верижна реакција (PCR). Тоа е амплификациона техника која дава можност на амплификација на специфични секвенци од мала количина ДНК. При PCR еден или повеќе олигонуклеотидни прајмери се користат за хибридување на спротивната ДНК верига прилепувајќи се на саканата секвенца од таргетната ДНК. На тој начин, со ДНК полимеризацијата се креира копија од таргетната ДНК (18, 17, 21, 29). Експоненцијалната амплификација посредува со циклуси од греење и ладење и може да произведе  $10^6$  -  $10^9$  копии од таргетната ДНК секвенца (17, 29). Техниката е ефикасна со примероци кои содржат мала биомаса (3). На пример, сега е можно да се идентификуваат индивидуални ларви или јајца од *Meloidogyne* spp. врз основа на разликите во митохондриалните интергенски региони (20).

Целта на ова наше испитување беше да се изврши прецизна идентификација на нематодите од родот *Meloidogyne* во неколку локации во Македонија. Ова го остваривме главно со два приоди за идентификација: морфолошки и молекуларен. Со тоа ја поставивме основата за понатамошни испитувања во областа на фитонематологијата во Македонија особено за употреба на заштитни мерки кои не вклучуваат употреба на нематоциди туку само плодоред и употреба на сорти отпорни на нематоди од родот *Meloidogyne*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Нематолошки преглед беше извршен во 11 локации во Македонија: 9 оранжериски (Богданци, Хамзали, Банско, Просениково-струмичко, Кочани, Гевгелија, Куманово, Градско, Гевгелија) и 2 тутунски локации во струмичко (Иловица и Штука). Вкупно 25 популации беа собрани и 73 монокултурни изолати добиени. *Meloidogyne* популациите беа собрани со собирање на заразени корења и ризосферна почва, или само почва, во периодот од 1996-97 година. Популациите беа одржувани и пропагирани на *Lycopersicon esculentum* сорта Money maker на 20-25 °C, прихранувани регуларно и наводнувани во зависност од почвената влажност.

Монокултурните изолати ги добивме со инокулација со единечни јајни маси од *Meloidogyne* spp., на три недели стари растенија од домати, сорта Money maker. Инокулираните растенија беа чувани во оранжерии на температура од 20 - 25°C. Женките и кореспондентните јајни маси беа собрани 7 недели по инокулацијата. Женките се користеа за подготвување на препарати од перинеално поле а  $L_2$  се испилуваа во вода и чуваа на 4 °C до нивно користење. Мажјациите беа екстрахирани од ризосферната почва (Ayoub, 1977).

Изолатите беа идентификувани со два приода: 1. со одредување на морфолошките карактеристики на адултни женки и морфометрични анализи на мажјаци и  $L_2$  (15) и 2. со амплификација на интергенскиот регион помеѓу цитохром оксидазата II ген и 16S рРНК генот во митохондриалниот геном на индивидуална ларва (20).

**Морфолошки приод:** Корените заразени со нематоди беа фиксирани во лактофенол-метиленско сино. Методите користени при работење, фиксирање и приготвување на привремени и трајни препарати за таксономски изучувања се опишани во Japson 1987. Трајни препарати од цели женки беа ретко припремани бидејќи истите многу малку се користат при идентификацијата. Најмалку 15 женки од изолат беа користени за припрема на препарати од

перинално поле. Мажјаците и  $L_2$  беа фиксирани во ТАФ при  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , а покасно извршена морфолошка и морфометричка анализа на истите.

Големите морфолошки варијации кај *Meloidogyne* spp. ја отежнуваат идентификацијата на истите. Поради тоа за сигурност во идентификацијата ние користевме и молекуларен приод за идентификација на истите изолати, кој е доста попрецизен.

**Молекуларен приод:** Се базира на разликите во димензиите на интергенетскиот регион од мтДНК кај  $L_2$  од различни видови. Harris et al 1990, користеле PCR за амплификација на мтДНК од единечна  $L_2$  или јајце. Подоцна тие извршиле модификација на протоколот, неговата молекуларна основа, и неговата корисност при идентификација на петте најраспространети *Meloidogyne* видови (20). Оваа техника вклучува амплификација на интергенетскиот регион помеѓу цитохром оксидаза субединица II генот и 16S рРНК генот во митохондриалниот геном на нематодите (28).

Дијагностичкиот асеј се состои од 3 основни дела: изолација на нематоди, ДНК амплификација со сет од различни прајмери и евалуација на амплифицираниот продукт (20):

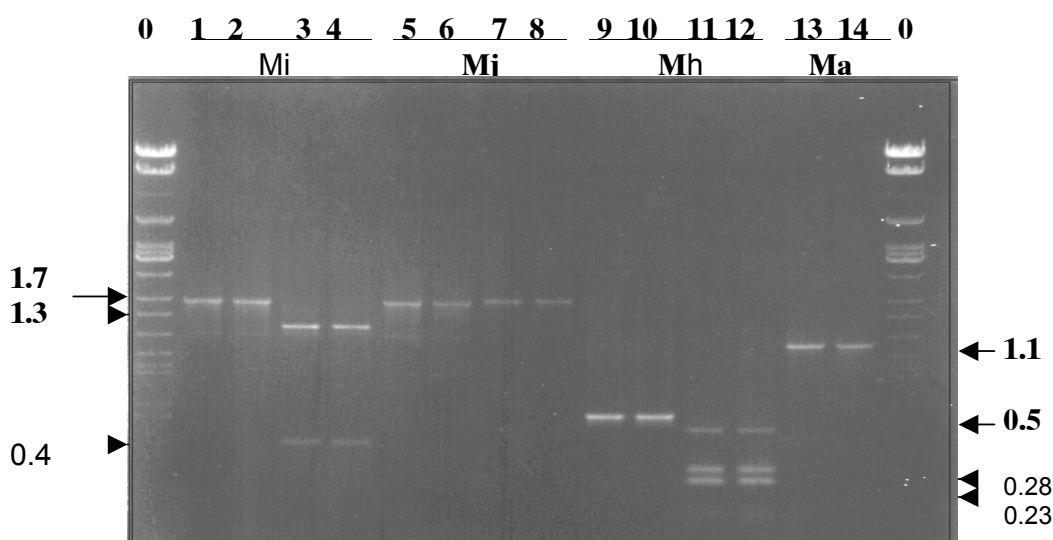
- Индивидуални  $L_2$  беа ловени со нематолошки јадици и ставани во  $15\text{ }\mu\text{l}$  капка стерилна вода на предметно стакло. Нематодата беше хомогенизирана со благо притискање со стаклено стапче за да може да се види лизирањето. Во тој момент хомогенатот може да се чува на  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  или директно да се користи за PCR.
- За ДНК амплификацијата, прајмерите (#C2F3 и #1108) и PCR реагенсите (20) беа припремени во краен волумен од  $25\text{ }\mu\text{l}$  под минерално уље. Содржината се става во ДНК термоциклер претходно загреан на  $94\text{ }^\circ\text{C}$  за модифициран "hot start". PCR амплификационите услови беа следните: денатурација на  $94\text{ }^\circ\text{C}-1''$ , анелирање на  $48\text{ }^\circ\text{C}-1''$  и елонгација на  $70\text{ }^\circ\text{C}-2''$ , 45 циклуси. Пет минути инкубационен период на  $72\text{ }^\circ\text{C}$  следеше по последниот циклус за да се комплетираат делумно синтетизираните двојни синцири. По ДНК амплификацијата, продуктите беа проверени на агарозен гел, обоен со етидиум бромид и визуализирани на УВ зраци.
- Стандардна рестрикциона дигестија на амплифицираниот продукт беше извршена на  $10\text{ }\mu\text{l}$  од продуктот и евалуиран на агарозен гел. HinfI и DraI дигестиите беа извршени за 2-4 часа на  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Постојат прелиминарни испитувања кои укажуваат на економската важност на галовите нематоди во Македонија (24, 16, 5, 6, 7, 8, 9). Сепак малку се знае за таксономскиот статус на овие патогени и за географското распространување на интерспецифичните варијанти. Овој недостиг на податоци е сериозен проблем за ефикасна контрола на фитопаразитните нематоди со примена на плодоред и употреба на отпорни сорти.

Од 11 локации кои беа предмет на испитување, во 9 (82%) детектиравме присуство на нематоди од родот *Meloidogyne*. Само во нематолошките проби од оранжериите во Валандово и Градско имавме негативни резултати при проверка на присуството на овие патогените.

Максимум 15 перинални полиња од изолат беа определувани и 25 мажјаци и  $L_2$  морфометрички анализирани. Најмалку 10 единечни  $L_2$  од изолат беа идентификувани користејќи прајмери чии анелирачки положби беа лоцирани на 3' делот од митохондриалниот ген кој кодира за цитохром оксидазата поединица II и во 16S рРНК генот. По PCR амплификацијата, фрагменти со 3 големини беа детектирани. Дигестија на амплифицираниот продукт со рестриktivни ендонуклеази овозможија разделување помеѓу видовите со идентична големина на амплифициран продукт. 1.7 кб фрагмент се амплифицира од *M. incognita* и *M. javanica*, 1.1 кб фрагмент се амплифицира од *M. arenaria* и 0.5 кб бенд за *M. hapla* (Slika 1). Успеавме да овие резултати ги репродуцираме при нашите анализи и да овој метод го користеме за рутинска идентификација на ларви од *Meloidogyne* spp. Општо земено, ние добивме успешна амплификација на околу 90% од индивидуалните  $L_2$ .



**Слика 1:** PCR амплификација од мтДНК на индивидуални ларви користејќи PCR прајмери и услови опишани во Powers & Harris (1993). 1.7-кб продукт е карактеристичен за *M. incognita* и *M. javanica* (линии 1, 2, и 5, 6, респективно). 0.5-кб продукт ги определува *M. hapla* (линии 9, 10,) и 1.1-кб продукт ги карактеризира *M. arenaria* (линии 13, 14). *Hinf* I дигестирани продукти на амплифицираниот 1.7-кб продукт од *M. incognita* и *M. javanica* (линии 3,4 и 7, 8, респективно). *Dra* I дигестивен продукт од амплифицираниот 0.5-кб фрагмент од *M. hapla* (линии 11, 12). Првата и последната линија 0 - се  $\lambda$  маркерот со стандардни димензии.

**Figure 1:** PCR amplification of mtDNA from single juveniles using PCR primers and conditions described in Powers & Harris (1993). The 1.7-kb product is characteristic of *M. incognita* and *M. javanica* (lines 1, 2, and 5, 6, respectively). The 0.5-kb product identifies *M. hapla* (lines 9, 10,) and the 1.1-kb product characterises *M. arenaria* (lines 13, 14,). *Hinf* I digestion products of the amplified 1.7-kb fragment of *M. incognita* and *M. javanica* (lines 3,4 and 7,8, respectively). *Dra* I digestion product of the amplified 0.5-kb fragment of *M. hapla* (lines 11, 12). In the first and the last line 0 - are included  $\lambda$  marker as a size standards.

За разделување на *M. incognita* од *M. javanica*, *Hinf* I дигестија беше неопходна и проверка на дигестираниот продукт на агарозен гел. Според Power & Harris (1993), тоа треба да резултира во два бенда (1.0 и 0.7 кб) за *M. javanica* и три бенда (1.0, 0.4 и 0.3 кб) за *M. incognita*. Во нашиот случај, само еден бенд (1.7 кб) добивавме од *M. javanica*, индицирајќи дека нема дигестија и два бенда (1.3 и

0.4 кб) беа присутни во *M. incognita* дигестиите (Слика 1). Овие резултати беа репродуцирани ка сите изолати од нематоди од овие видови. Причината за несовпаѓање со резултатите од Powers and Harris (1993) не е познат но може да е поради различните извори на PCR ензими користени во двете лаборатории. Спротивно на ова, нашите резултати во потполност се идентични со резултатите на Williamson (1994) кои имаат добиено дигестивни продукти како нашите. Како и да е, и во двете лаборатории *M. incognita* и *M. javanica* се лесно разликуваат. Техникава е корисна за проучување на мешани популации, поради можноста за идентификација на индивидуални Л<sub>2</sub>. 1.1кб бенд се добиваше од *M. arenaria* исолати и немаше потреба од дигестија поради тоа што тоа е единствениот вид кој дава фрагмент со оваа големина. За да се раздвои *M. hapla* од можно присуство на други видови кои даваат бенд со оваа димензија (Пр. *M. chitwoodi*) беше неопходно да се врши дигестија на амплифицираната ДНК (0,5 кб големина), со рестриктивен ензим DraI. По дигестијата два бенда (280бп и 230 бп) се добиваа од *M. hapla* дигестиите. Недостаток на оваа метода е потребата од рестриктивна дигестија на PCR продуктот проследен со електрофореза. Исто така, оваа метода не овозможува идентификација на подвидови и раси.

Табела 1: Потекло на популациите и идентификувани Meloidogyne видови (1996/97).

Table 1: Origin of the populations and identified Meloidogyne species (1996/97)

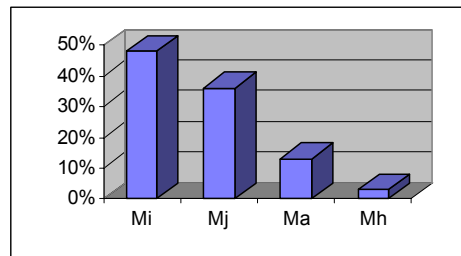
Poteklo	Posledna odg. kul tura	I dent i f i k uvan vid	Br oj na popul aci i	Br oj na i zol ati
Origin	Last field grown-crop	Species identified	Number of populations	Number of lines
Bogdanci	domat i	<i>M. incognita</i>	1	7
Hamzali	kr ast avi ci	<i>M. incognita</i>	3	12
		<i>M. arenaria</i>	1	3
Bansko	domat i	<i>M. javanica</i>	1	2
	kr ast avi ci	<i>M. incognita</i>	1	4
I l ovi ca	t ut un	<i>M. incognita</i>	2	5
P r o s e n i k o v o	kr ast avi ci	<i>M. incognita</i>	2	7
		<i>M. javanica</i>	1	2
		<i>M. arenaria</i>	1	1
K o ~ a n i	kr ast avi ci	<i>M. javanica</i>	1	3
		<i>M. javanica</i>	2	8
		<i>M. arenaria</i>	1	1
		<i>M. hapla</i>	1	1
Gevgel i ja	domat i	<i>M. javanica</i>	1	7
K u m a n o v o	domat i	<i>M. javanica</i>	1	4
		<i>M. hapla</i>	1	1
[ t u k a	t ut un	<i>M. arenaria</i>	1	5

Од девет локации каде беше детектирано присуство на галови нематоди во пет локации идентификувавме нематоди од видот *M. incognita* и тоа: оранжериите во Богданци, Ханзали, Банско и Просениково, како и во тутунските анализи од Иловица - струмичко. Видот *M. javanica* беше исто така застапен во пет локации и тоа: оранжериите во Кочани (33"М. Пијаде"), Гевгелија, Куманово

**Хамзали и Просениково. Во четири испитувани локации детектиравме присуство на *M. arenaria*: оранжериие во Кочани, Хамзали, Просениково и тутнските анализи од Штука-струмичко. Видот *M. hapla* го детектиравме само во две оранжериско локации: Кочани и Куманово.**

**Слика 2.: Квалитативен и квантитативен состав на *Meloidogyne* spp. од 11 испитувани локации во Македонија.**

Figure 2.: Qualitative and quantitative composition of *Meloidogyne* spp. from 11 investigated locations in Macedonia



Триесет и пет од 73 монокултурни изолати кои се идентификуваа припаѓаа на *M. incognita* (48%), 26 изолати на *M. javanica* (36%), 10 изолати на *M. arenaria* (13%) и само 2 изолати на *M. hapla* (3%). Процентуалниот квалитативен и квантитативен состав на испитуваните Македонски популации галови нематоди е прикажан во Слика 2.

## ЗАКЛУЧОК

Прецизната идентификација на нематодите не може да биде прецената, посебно при иницијацијата на научните програми и развојот на контролните стратегии. Главните контролни мерки како што се плодоред и употреба на отпорни сорти се главно видово и расно специфични.

Поради тоа, за развој на сорти отпорни на нематоди, точната идентификација на нематодните популации кои се испитуваат мора да се познати. Така, успешна препорака за плодоред неможе да се даде доколку идентитетот на доминантните нематодни видови и раси не се знае. Ако идентитетот на популациите е непознат или се претпоставува, културата селектирана како повољна за плодоред може да предизвика драматично зголемување на нематодната популација.

При употребата на класичните и современите методи за идентификација на *Meloidogyne* spp. и извршената идентификација на истите го констатиравме следното:

1. Морфологијата на адултна женка е обично најважниот карактер при класичната идентификација на *Meloidogyne* spp. Бидејќи неможеме нив да ги најдеме слободни во почвата ние мора да ги произведеме во оранжерии, за идентификациони цели, па употребата на овие методи е долготрајна. Фитопаразитните нематоди е тешко и неможно да се идентификува поради малите димензии, недостиг на јасно определливи морфолошки карактеристики и идентичност на истите. Затоа, употребата на овие методи бара и тесно специализиран кадар.
2. Употребата на класичните методи не ни овозможува идентификација на  $L_2$  и јајца а тоа се инвазионите и презимувачки стадиуми на најголем дел од фитопаразитните нематоди.
3. Употребата на молекуларни маркери за идентификација на нематодните видови ја зголемува детекционата сензитивност во примерокот.

4. Употребата на современите методи ја зголемува и брзината на квантифицирање на нематодните видови детектирани во научни или менаџментски примероци.
5. Современите методи на идентификација, базирани на PCR методи, ни дават можноста да се идентификуват индивидуални  $L_2$  или јајца.
6. *Meloidogyne* spp. се широко распространети паразити и се познатикако агресивни растителни патогени на многу економско важни култури во Македонија. Од испитуваните локации во Македонија, во 82% детектираваме присуство на *Meloidogyne* spp.
7. Сите изолати припаѓаа на четирите агрономско најважни *Meloidogyne* видови во светот. Квалитативниот и квантитативниот состав на *Meloidogyne* spp. во испитуваните локации во Македонија е следниот: 48% припаѓаа на *M. incognita*, 36% на *M. javanica*, 13% на *M. arenaria* и 3% на *M. hapla*.
8. Прегледот на македонските испитувања во областа на нематологијата укажува на нецелосна и нејасна претстава за присутноста и обилноста на *Meloidogyne* spp. во Македонија. Тоа е поради фактот дека нематолошките испитувања се од регионален карактер, некомплетни и ограничени.
9. Од горе наведеното може да заклучиме дека неопходни се натамошни испитувања за дистрибуцијата и биолошки карактеристики на *Meloidogyne* spp (како и на другите фиропаразитни нематоди) и интер- и интраспецифични вариации на вирулантноста кои скоро комплетно недостасуваат, во споредба со незанемарливата економската важност на овие патогени во Република Македонија.

## БЛАГОДАРНОСТ

Изразуваме благодарност за укажаната техничка и стручна помош на Проф. Др. Г. Ефремов и вработените во Центарот за Нови Технологии и Генетско Инжинерство при МАНУ, Скопје.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Allen MW (1952) Observations on the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 19: 44-51.
2. Ayoub SM (1977) Plant Nematology an Agricultural Training Aid, CDFa, Ca
3. Caswell-Chen EP et al (1993) Applied Biotechnology in Nematology, Supplement to Journal of Nematology 25(4s): 719-730.
4. Chitwood BG (1949) 'Root - knot nematodes' - Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldy, 1887. Proc Helm Soc Washington 16: 90 - 104.
5. Даутова М, Пеливаноска В & Вучков Р (1995) Динамика на биоелементи, принос и квалитет на тутун заразен со нематоди од родот *Meloidogyne* spp., XVIII – Тутунски симпозиум, Охрид - Република Македонија, Зборникна трудови, 1995.
6. Даутова М, Спасеновски М & Вучков Р (1993) Влијание на кореновите нематоди (*Meloidogyne* spp) врз морфолошките карактеристики и содржината на вода кај домати во тек на растотг, Меѓународен симпозиум, Нови технологии во производство на зеленчук и цвеќе, Охрид - Република Македонија, Зборник на трудови, 1994.
7. Даутова М, Спасеновски М & Вучков Р (1993) Влијание на кореновите нематоди (*Meloidogyne* spp) врз динамиката на растителните пигменти и приносот кај доматиите, XVIII Симпозиум за заштита на растенија, Охрид - Република Македонија, Зборник на трудови, 1994.
8. Даутова М, Спасеновски М & Вучков Р (1994) Компаративни следења на промените кај доматиите (*Lycopersicum esculentum* Mill) предизвикани од фитопаразитни нематоди, XIX

- Симпозиум за заштита на растенија, Охрид - Република Македонија, Зборник на трудови, 1995.**
9. **Даутова М, Спасеновски М & Вучков Р (1995) Морфолошки карактеристики, содржина на растителни пигменти, квалитет и принос на тутун заразен од нематоди на родот Meloidogyne, XX Симпозиум за заштита на растенија, Охрид - Република Македонија, Зборник на трудови, 1996.**
  10. Dropkin VH (1953) Studies on the variability of anal plate patterns in pure lines of Meloidogyne spp., the root-knot nematode. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 20: 32-39. Sanders H & Mulet J (1976) 'E' type perineal patterns in Meloidogyne species. Nematologica 22: 373-376.
  11. Eisenback JD & Triantaphyllou HH (1991) Root-knot nematodes: Meloidogyne species and races. In: Nickle WR (Ed) Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker Inc, New York USA, 191-273
  12. Esser RP et al (1976) A diagnostic compendium of the genus Meloidogyne (Nematoda: Heteroderidae). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 43: 138-150. Netcher C (1976) Morphological and physiological variability of species of Meloidogyne in West Africa and implications for their control. Meded. Landbouw. Wageningen, Nederland 78: 1-46.
  13. Harris TS, Sandall LJ & Powers TO (1990) Identification of single Meloidogyne juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. J Nematology 22: 518 - 524.
  14. Harris TS, Sandall LJ & Powers TO (1990) Identification of single Meloidogyne juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. J Nematology 22: 518 - 524.
  15. Jepson SB (1987) Identification of root-knot nematodes (Meloidogyne species). CAB int, Wallingford UK, 265 pp.
  16. Krnjaic DZ (1977) Fitofagne nematode u staklarama SR Makedonije, Zastita bilja 142: 429-433.
  17. Mullis KB (1990) The unusual origin of the polimerase chain reaction. Scientific American 262 (4): 56-65.
  18. Mullis KB et al (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology, 50: 263-273.
  19. Netcher C (1977) Observations and preliminary studies on the occurrence of resistance breaking biotypes of Meloidogyne spp. on tomato. Cahiers ORSTOM Series Biologie 11: 173-178.
  20. Powers TO & Harris TS (1993) A polymerase chain reaction method for identification of five major Meloidogyne species. J Nematology 25: 1 - 6.
  21. Saiki RK et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
  22. Sanders H & Mulet J (1976) "E" type perineal patterns in Meloidogyne species. Nematologica 22: 373-376.
  23. Taylor AI & Sasser JN (1978) Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species), International Meloidogyne Project, North Carolina University, Raleigh, N.C. 27607.
  24. Todorovski B (1958) Nematodite opasni stetnici na tutunot. Tutun 3. Prilep.
  25. Triantaphyllou AC & Sasser JN (1960) Variation in perineal patterns and host specificity of Meloidogyne incognita. Phytopathology 50: 724-735.
  26. Whitehead AG (1968) Taxonomy of Meloidogyne (Nematodea: Heteroderidae) with description of four nematode species. Trans. Zool. Soc., London 31: 263-401. Allen MW (1952) Observation on the genus Meloidogyne Goeldi, 1887. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 19: 44-51.
  27. Williamson VM (1992) Molecular techniques for nematode species identification. Pp 107-123 in WR Nickle, ed Manual of agricultural nematology. New York: Marcel Dekker.
  28. Williamson VM et al (1994) PCR for nematode identification, Advanced in Molecular Plant Nematology, pp. 119-127 Ed. By F. Lamberty et al, Plenum Press, New York.
  29. Xu LZ & Larzul D (1991) The polymerase chain reaction: Basic methodology and applications. Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Disease 14: 209-221.