



Review of New Approaches in Nematodes Taxonomy

MOHAMMAD ABDOLLAHI[✉] & EHSAN FATEMI

Professor and MSc. Student of Nematology, Department of Plant Protection,
Yasouj University, Yasouj, Iran ([✉]Corresponding author: abdollahi@yu.ac.ir)

Received: 05.07.2016

Accepted: 04.01.2017

Abdollahi M. & Fatemi E. 2017. Review of new approaches in nematodes taxonomy. *Plant Pathology Science* 6(1): 1-11.

Abstract: Use of advanced methods in nematode taxonomy and biodiversity is growing rapidly. Because the morphological and morphometric characteristics of nematodes are not enough for accurate nematode identification, the modern techniques were established to terminate the taxonomic challenging. According to the progress achieved, some new approaches such as molecular studies have enhanced the nematode diagnosis. Numbers of molecular techniques like RAPD, RFLP, AFLP, ISSR and SCAR have been established to give confirmation to traditional detection, especially for identification of undescribed species. In this review, every one of each new technique is discussed.

Key words: Biodiversity, Morphologic, Molecular taxonomy

مروری بر رویکردهای نوین در آرایه‌بندی نماتدها

محمد عبداللهی[✉] و احسان فاطمی

استاد و دانشجوی کارشناسی ارشد نماتدشناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵

دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۱۵

عبداللهی م. فاطمی. ۱۳۹۵. مروری بر رویکردهای نوین در آرایه‌بندی نماتدها. دانش بیماری‌شناسی گیاهی (۱): ۱-۱۱.

چکیده: کاربرد روش‌های پیشرفته در آرایه‌بندی و تنوع زیستی نماتدها به سرعت گسترش یافته‌اند. با توجه به اینکه مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنگی نماتدها برای تشخیص دقیق آن‌ها کافی نیست، روش‌های جدیدی برای خاتمه دادن به موارد بحث‌برانگیز ایجاد شده‌اند. با پیشرفتهایی که اخیراً حاصل شده، رویکردهای جدیدی چون روش‌های مولکولی تشخیص نماتدها را تسريع کرده‌اند. روش‌های مولکولی مختلف رویکردهای SCAR, AFLP, RFLP, RAPD و ISSR به منظور تأیید تشخیص‌های سنتی، به‌ویژه برای گونه‌های توصیف نشده، ایجاد شده‌اند. در این مقاله مروری، هر یک از این روش‌ها بحث شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: تنوع زیستی، ریخت‌سنگی، آرایه‌بندی مولکولی

مقدمه

نماتدها جاندارانی پرسلوی متعددی هستند که تعداد کل گونه‌های آن‌ها بالغ بر یک میلیون تخمین زده می‌شود (McCarter 2009). لامبزید (Lambshead 2004)، خسارت واردشده به محصولات کشاورزی توسط نماتدها در سال ۲۰۰۱ را حدود ۱۱۸ میلیارد دلار تخمین زده است که حدود نیمی از این مبلغ مربوط به خسارت واردہ دو محصول برج و ذرت بوده است. با این وجود، مطالعات زیادی روی نماتدها صورت نگرفته است. تعداد ۲۶۰۰ گونه از نماتدها (کمتر از ۳٪ کل گونه‌های تخمین زده) توصیف شده‌اند (Hugot *et al.* 2001, Hallan 2007) در این مقاله روش‌های جدیدی که برای تشخیص و شناسایی نماتدها به کار گرفته می‌شود، مرور می‌گردد.

۱- اهمیت آرایه‌بندی

شناسایی نقش اساسی و زیربنایی در فهم نقش زیست‌بوم‌شناسی هر موجود زنده دارد (Kotliar 2000). هیوگات (Hugot 2002)، بر نیاز به روش‌های شناسایی دقیق و صحیح تأکید کرده و اعلام کرده که نیاز کنونی آرایه‌بندی نماتدها، پر کردن فاصله‌ی بسیار زیاد بین تعداد گونه‌های تخمینی نماتدها و تعداد گونه‌های نماتدهای شناسایی شده است. به دلیل اهمیت اقتصادی نماتدهای انگل گیاهی در کشاورزی و اهمیت نماتدهای انگل جانوری در بهداشت، شناسایی نماتدها در این دو مورد پیشرفت قابل توجهی داشته‌اند و به همین دلیل گونه‌های نماتدی مؤثر در کشاورزی و بهداشت بیشتر از گونه‌های آزادی در سطح گونه و زیرگونه آرایه‌بندی شده‌اند (Abebe *et al.* 2011). بر اساس آرایه‌بندی قدیمی و مصنوعی، گونه‌های انگل جانوری از بقیه گروه‌های نماتدها جدا شده‌اند، بنابراین برای رعایت اختصار در این مقاله فقط گونه‌های آزادی و گونه‌های انگل گیاهی در نظر گرفته شده است.

۲- روش‌های جدید مطالعه تنوع زیستی نماتدها

دانش نماتدشناسی در حال تغییر رویکرد از آرایه‌بندی ریخت‌شناسی به سمت استفاده از تلفیق ریخت‌شناسی و روش‌های مولکولی است (Powers *et al.* 1997, Powers 2004). تنوع زیستی مبتنی بر ریخت‌شناسی همیشه متناظر با تنوع زیستی مبتنی بر ژنتیک و بالعکس نیست. درک اهمیت این مشکل باعث

شد که محققین استفاده از فناوری‌های موجود برای مستندسازی و تبادل یافته‌ها ریخت‌شناسی، به طرقی کامل و سریع را مدنظر قرار دهند (De Ley & Bert 2002). عکس‌برداری چند کانونی دیجیتال (DMI) به کمک تبادل یافته‌ها ریخت‌شناسی آمده است (Eyualem *et al.* 2004). در هم آمیختن فناوری ثبت یافته‌ها و اینترنت، دسترسی خوبی به یافته‌های ریخت‌شناسی برای همه در جهان ایجاد کرده است (Eyualem *et al.* 2006). استفاده از تصویربرداری ویدیویی باعث شده که مدارک و شواهد به فرم مجموعه‌هایی به موزه‌ها فرستاده و باعث تقویت ذخایر یافته‌های شوند (De Ley & Bert 2002). تصویربرداری از نمونه‌های شاهد برای ارتباط دادن آرایه بندی نماتدهای شناخته شده با گونه‌هایی که در آینده کشف خواهند شد، ضرورت دارد. تلاش‌های مستمر برای گردآوری این تصاویر در کلیدهای برخط و قابل دسترس باعث فراهم شدن زمینه‌های جدید در دانش آرایه بندی نماتدها و تبادل یافته‌ها ریخت‌شناسی خواهد شد (Eyualem *et al.* 2004).

۳-روش‌های مولکولی شناسایی نماتدها

روش شناسایی با استفاده از ریخت‌شناسی سال‌ها بود که به گستردگی برای شناسایی نماتدها بکار می‌رفت. با افزایش دانش در زمینه‌ی نماتدهای مهم در کشاورزی، مشخص شد که ریخت‌شناسی به تنها یابی قادر به ارایه‌ی تصویر کاملی از تفاوت‌های بیماری‌زاوی مشاهده شده بین جمعیت‌هایی که از نظر مشخصه‌های ریخت‌شناسی در یک گونه قرار داده شده‌اند، نمی‌باشد. درنتیجه، محققین در پی یافتن روش‌هایی بودند که بهتر بتوانند رفتارهای بیماری‌زاوی بین جمعیت‌های درون گونه‌ای نماتدها را پیش‌بینی کنند. به این منظور، روش‌های مولکولی ابداع شده‌اند که قادرند نماتدها را از نظر کمی و کیفی در سطح گونه و پایین‌تر از گونه شناسایی کنند. روش‌هایی مانند تحلیل الگویی آیزوزاویم‌ها، تحلیل چندشکلی در طول قطعات محدود (RAPD)، تکثیر تصادفی ماده وراثتی با استفاده از آغازگرهای تصادفی (RAPD)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RFLP)، چندین نماتد مهم آفت کشاورزی به کار رفته‌اند. این روش‌ها هر یک مزایا و محدودیت‌هایی داشته‌اند (جدول ۱). از بین این روش‌ها، توالی‌های DNA ژن، واسرتست‌سازی شیبی ژل الکتروفورز (DGGE) و روش جدیدتر Pyrosequencing (تعیین توالی DNA بر اساس توالی‌های سنتزی)، سه روشی هستند که برای

جدول ۱- محدودیت‌ها و کاربردهای روش‌های مولکولی در شناسایی نماتدها

روش	موارد کاربرد	محدودیت	مثال از کاربرد
Allozymes		- اساس زیستکی تأیید نشده. - نسخنوار از آن برای مطالعه بر روی یک نماد استفاده کرد - مخصوص مرحله‌ی خاصی از زندگی نماتد - قادر اطلاعات برای مشخصه‌های خاصی از نماد - نیاز به پرتوتین‌های غیرواسرت شده	- جنس‌های نماتدی مشخص شد، با استفاده از این روش <i>Pratylenchus Heterodera Meloidogyne</i> (Shabani &) <i>Aphelenchus</i> و <i>Ditylenchus</i> (Triantaphylou 1990, Navas et al. 2001)
(RFLP)	- مناسب برای انتقال گونه‌های یک گونه (Curran et al. 1985, 1986, Powers et al. 1986, Castagnone-Sereno et al. 1991, 1993, Garate et al. 1991, Cenis et al. 1992, Pioche et al. 1992, Xue et al. 1992, Fargette et al. 1996) - تشخیص گونه‌ها یا جمیعت‌های یک گونه (Subbotin et al. 1999) <i>Heterodera avenae</i> group	- مناسب بین مشخصه‌ها وجود ندارد - نزدیک بر اساس حضور/عدم حضور PCR - برای استفاده از آزمیزهای مختلف محدود نشست - مناسب برای ارزیابی نوع درون گونه‌ای (Waeyenberge et al. 2000)	- چندشکلی در طول قطعات محدود گروهی از قطعات محدود نشست
(AFLP)	- تشخیص گونه‌ها در گروه <i>Radopholus similis</i> (Elbadri et al. 2002)	- مناسب برای ارزیابی نوع درون گونه‌ای	- چندشکلی در طول قطعات تقویت شده
(RAPD)	- تشخیص <i>G. pallida</i> , <i>Globodera rostochiensis</i> و <i>M. Meloidogyne incognita</i> (Fullaondo et al. 1999), <i>M. arenaria</i> و <i>Japonica</i> (Zijlstra et al. 2000)	- نامناسب برای تمام موجودات زنگ و نافذ نکارپذیری حساس به تغیرات در ظرف پرایمرو DNA	- این روش برخلاف روش AFLP به مرحله‌ی محدودسازی نیاز دارد - ساده و سریع
Real-time PCR	- تشخیص نماتد میتوپلیزبی (G. pallida) و نماتد سبی (Heterodera schachtii) (Subbotin et al. 2007) و نماتد سبی چندنفره (Meloidogyne spp) از گروه‌های <i>Pratylenchus neglectus</i> و <i>Pratylenchus thomae</i> (Madami et al. 2005, Stirling et al. 2004, Hollaway et al. 2004)	- نیازمند پرایمر گونه‌های خاص زمانبندی دارد	- تشخیص گونه‌های کمی گونه‌ها سریع و دقیق
Multiplex PCR	- شناسایی <i>P. penetrans</i> (Fullaondo et al. 1999), <i>Meloidogyne</i> (Setterquist et al. 1996) scribneri و <i>P. fallax</i> و <i>chitwoodi</i> (Petersen et al. 1997) و <i>P. looisi</i> و <i>coffeeae</i> (Uehara et al. 1998)	- شامل پهیمسازی هفلت صرف، نوع در annealing تماملات پرایمرو و نکلر محصولات غيراختصاصی نیازمند پرایمرو گونه‌های خاص	- تشخیص پیش از یک گونه در یک زمان مقرون به صرفه سریع
DNA sequencing	- بهتر گستردگی در سالهای اخیر استفاده نموده در گروه‌های مختلف از جمله خانواری <i>Hoplolaimidae</i> (Subbotin et al. 2007), راستی <i>Tylenchida</i> (Subbotin et al. 2006), زیر راستی <i>Cricotomatidae</i> (Nadler et al. 2006), زیر <i>Cephalobina</i> (Al-Banna et al. 1997) <i>Pratylenchus</i> (Steiner et al. 1999), <i>Acroboloides</i> (Castillo et al. 2001) و <i>Meloidogyne</i> (Stock et al. 2001), (Mekete et al. 2009) <i>Longidorus</i> (2003)	- ترجیح داده می‌شود تسبیب به روش‌های ذکر شده در بالا که در این روش مولملن گروه‌های نماتدی، که هم در زیستی شناسایی ناکنونی و هم در زیستی استنباط فیلوزوتیک تاکنکد، دشوار می‌باشد. انتخاب نشانگر مولکولی هنوز یک مسئله حل شده است.	- نسخنوار (DNA) نوای نوای نوای بیوئی شود روش آسان و ساده برای تجزیه و تحلیل است محبیت‌های نماد مورداستفاده برای انتقال گونه‌های متعدد
(DGGE)	- تجزیه و تحلیل جمیعت‌ها در اکوپیتم‌های مختلف (Foucher et al. 2004, Griffiths et al. 2006, Shi-Bin et al. 2008, Waite et al. 2003, Foucher et al. 2004)	- استخراج DNA برای روش DGGE مشکل است	- روش آسان و ساده برای تجزیه و تحلیل جمیعت‌های نماد کتروforeز

مطالعه‌های تنوع زیستی نماتدهای آزادی به کار رفته‌اند. در مورد محدودیت‌های استفاده از توالی‌های DNA برای تشخیص گونه‌ها گزارش کاملی ارائه شده است (Lee 2004). البته به نظر می‌آید که در این گزارش تفاوت بین دو رویکرد متفاوت در استفاده از توالی‌های DNA برای ثبت تنوع زیستی نماتدها به خوبی شرح داده نشده است. اولین رویکرد، تلاش می‌کند زن‌های را بیابد که امید می‌رود بتوان از آن‌ها، برای پیش‌بینی تشخیص یا وجود گونه‌ها استفاده بشود (Hebert *et al.* 2003, Fre'zal & Leblois 2008). اما رویکرد دوم تلاش می‌کند که داده‌های به دست آمده به روش مولکولی را در راستای آرایه‌بندی سنتی گونه به کار ببرد. رویکرد دوم در تلاش است که تنوع زیستی را در سطح مولکولی و به روش عملیاتی ثبت کند و به‌وضوح بیان می‌کند که عناصر ثبت‌شده از تنوع زیستی لزوماً نباید انعکاس‌دهنده‌ی آن چیزی که به‌طور معمول به عنوان گونه در نظر می‌گیریم، باشد. تلاش برای مطابقت دادن توالی‌های DNA با تعریف کنونی گونه‌ها، از این مزیت برخوردار است که از نظر زیست‌شناسی معنی‌دار است و بنابراین اثر آن این است که نه تنها به ثبت تنوع زیستی می‌پردازد، بلکه عملی‌تر است و مشکلات ناشی از روش‌های سنتی را هم ندارد. این واقعیت که تبادل ژنتیکی در بین افراد کماکان نیروی محرکه‌ی نگهداری گونه‌ها به شکل جمعیت‌های مجزا می‌باشد، اعتبار Blaxter 2003 & 2004, Blaxter & Floyd 2003, Floyd *et al.* (2002). پژوهشی نشان داده که یک ژن به تنها یک می‌تواند مرزهای یک گونه را در بعضی نماتدها تعیین کند (Eyualem & Blaxter 2003) محدوده‌ی آرایه‌ها نیاز است (Fre'zal & Leblois 2008).

۴- اهمیت مطالعه‌های ریخت‌شناسی

برخی مطالعه‌های تنوع زیستی با این هدف است، که کلاً یافته‌های ریخت‌شناسی را کنار بگذارند و تنها از روش‌های مولکولی برای تعیین حدود و شناسایی آرایه‌های جانداران استفاده کنند (Edgcomb *et al.* 2002, Floyd *et al.* 2002, López-Garcia *et al.* 2003). البته سطح فعلی یافته‌های جمع‌آوری‌شده از توالی‌های DNA نماتدها برای مشخص کردن حدود یک گونه کافی نیستند، اما قابلیت منحصر به فرد تکرارپذیری آن‌ها کمک می‌کند که از تکرار توصیف‌های یک گونه جلوگیری شود (Tautz *et al.* 2002). به‌ رغم مزیت‌های آشکار روش مولکولی حرکت‌های عجولانه برای کنارگزاردن کلی یافته‌های ریخت‌شناسی، غیرمعتبر

می‌باشند. یافته‌های جمع‌آوری شده از روش‌های مولکولی بهترین ابزارهای کمکی برای تعیین حدود و شناسایی آرایه‌های نماتدها هستند (Mallet & Willmott 2003).

نتیجه‌گیری و پیشنهاد

پیشرفت‌های اخیر علم نماتدشناسی در آینده به نحو گریزناپذیر و فزاینده‌ای بر اساس روش‌های مولکولی است. دقیق و سریع بودن روش‌های مولکولی به نفع نماتدشناسی است. همان‌گونه که استفاده از این روش‌ها، باعث تشویق به ورود این گروه متنوع از حیوانات به جرگه‌ی مطالعات تنوع زیستی و زیستمحیطی خواهد شد. این یک قدم بزرگ در راستای دستیابی به درک بهتر از زیست‌شناسی و زیست‌بوم‌شناسی نماتدها خواهد بود. بنابراین، روش‌های مولکولی به ما کمک خواهند کرد که به اهدافمان یعنی ثبت و درک بهتر تنوع زیستی نماتدها، دست پیدا کنیم. به هر تقدیر، به رغم برخی دشواری‌ها در زمینه‌ی استفاده از ریخت‌شناسی در آرایه‌بندی برخی از نماتدها، در حال حاضر، حجم عظیمی از یافته‌ها در زمینه‌ی ریخت‌شناسی نماتدها در اختیار است، در نتیجه برقراری پیوند بین داده‌های ریخت‌شناسی و یافته‌های مولکولی پیشنهاد می‌شود.

References

منابع

1. Abebe E., Mekete T. & Thomas W. K. 2011. A critique of current methods in nematode taxonomy. *African Journal of Biotechnology* 10:312-323.
2. Adams B. 1998. Species concepts and the evolutionary paradigm in modern nematology. *Journal of Nematology* 30:1-21.
3. Adams B. 2002. The species delimitation uncertainty principle. *Journal of Nematology* 33:153-160.
4. Al-Banna L., Williamson V. & Gardner S. L. 1997. Phylogenetic analysis of nematodes of the genus *Pratylenchus* using nuclear 26S rDNA. *Molecular Phylogenet* 7:94-102.
5. Blaxter M. 2003. Molecular systematics: counting angels with DNA. *Nature* 421:122-124.
6. Blaxter M. 2004. The promise of DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 359:669-679.
7. Blaxter M. & Floyd R. 2003. Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. *Trends in Ecology* 18:268-269.

8. Castagnone-Sereno P., Piotte C., Abad P., Bongiovanni M. & Dalmasso A. 1991. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among *Meloidogyne incognita* populations. *Journal of Nematology* 23:316-320.
9. Castagnone-Sereno P., Piotte C., Uijthof J., Abad P., Wajnberg E., Vanlerberghe-Masutti F., Bongiovanni M. & Dalmasso A. 1993. Phylogenetic relationships between amphimictic and parthenogenetic nematodes of the genus *Meloidogyne* as inferred from repetitive DNA analysis. *Heredity* 70:195-204.
10. Castillo P., Vovlas N., Subbotin S. & Troccoli A. 2003. A new root-knot nematode: *Meloidogyne baetica* n. sp. (*Nematoda: Heteroderidae*) parasitizing wild olive in Southern Spain. *Phytopathology* 93:1093-1102.
11. Cenis, J., Opperman, C. & Triantaphyllou, A. 1992. Cytogenetic, enzymatic and restriction fragment length polymorphism variation of *Meloidogyne* spp. from Spain. *Phytopathology* 82:527-531.
12. Cook A., Bhadury P., Debenham N., Meldal B., Blaxter M., Smerdon G., Austen M., Lambshead P. & Rogers A. 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) as a tool for identification of marine nematodes. *Marine Ecology Progress Series* 291:103-113.
13. Curran J., Baillie D. & Webster J. 1985. Use of genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. *Parasitology* 90:137-144.
14. Curran J., McClure M. & Webster J. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. *Journal of Nematology* 18:83-86.
15. De Ley P. & Bert W. 2002. Video capture and editing as a tool for the storage, distribution, and illustration of morphological characters of nematodes. *Journal of Nematology* 34:296-302.
16. Edgcomb V., Kysela D., Teske A., De Vera G. & Sogin M. 2002. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:7658-7662.
17. Elbadri G., De Ley P., Waeyenberge L., Verstraete A., Moens M. & Vanfleteren J. 2002. Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing of the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 32:199-205.
18. Esbenshade P. & Triantaphyllou A. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22:10-15.

19. Eyualem A. & Blaxter M. 2003. Comparison of biological, molecular and morphological methods of species identification in a set of cultured *Panagrolaimus* isolates. *Journal of Nematology* 35:119-128.
20. Eyualem A., Baldwin J., Adams B., Hope D., Gardner S., Huettel R., Mullin P., Powers T., Sharma J., Ye W. & Thomas W. 2006. A position paper on the electronic publication of nematode taxonomic manuscripts. *Journal of Nematology* 38:305-311.
21. Eyualem A., Grizzle R., Hope D. & Thomas W. 2004. Nematode diversity in the Gulf of Maine, USA, and a web-accessible relational database. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 84:1159-1167.
22. Fargette M., Phillips M., Blok V., Waugh R. & Trudgill D. 1996. An RFLP study of relationships between species, populations, and resistancebreaking lines of tropical species of *Meloidogyne*. *Fundamental and Applied Nematology* 19:193-200.
23. Ferguson J. 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society* 75:509-516.
24. Floyd R., Eyualem A., Papert A. & Blaxter M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* 11:839-850.
25. Foucher A., Bongers T., Noble L. & Wilson M. 2004. Assessment of nematode biodiversity using DGGE of 18S rDNA following extraction of nematodes from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36:2027-2032.
26. Fre'zal L. & Leblois L. 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8:727-736
27. Fullaondo A., Barrena E., Viribay M., Barrena I., Salazar A. & Ritter E. 1999. Identification of potato cyst nematode species *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by PCR using species specific primer combinations. *Nematology* 1:157-163.
28. Garate T., Robinson M., Chacon M. & Park-House R. 1991. Characterization of species and races of the genus *Meloidogyne* by restriction enzyme analysis. *Journal of Nematology* 23:414-420.
29. Griffiths B., Donn S., Neilson R. & Dniell T. 2006. Molecular sequencing and morphological analysis of a nematode community. *Applied Soil Ecology* 32:325-337.
30. Hallan J. 2007. Synopsis of the Described Nematoda of the World. *Texas A & M Univ., College Station, TX. Online, http://insects. tamu. edu/research/collection/hallan/Nematoda/Family/ONematodalIndex0. htm*. [Accessed on 5-X-2013].
31. Hebert P., Ratnasingham S. & DeWard J. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London*. 270: S96-S99.

32. Hollaway G., Ophel-Keller K., Taylor S., Burns R. & McKay A. 2004. Effect of soil water content, sampling method and sample storage on the quantification of root lesion nematode (*Pratylenchus* spp.) by different methods. *Australasian Plant Pathology* 32:73-79.
33. Hugot J. 2002. Proposal for a network devoted to the study of nematology and helminthology. *Nematology* 4:563-565.
34. Hugot J., Baujard P. & Morand S. 2001. Biodiversity in helminths and nematodes as a field study: an overview. *Nematology* 3:199-208.
35. Kotliar N. 2000. Application of the new keystone-species concept to prairie dogs: how well does it work? *Conservation Biology* 14:1715-1721.
36. Lamshead P. J. D. 2004. Marine nematode biodiversity. pp.436-467. In: Z.X. Chen S.Y. Chen & D.W. Dickson (ed.). *Nematology, Advances and Perspectives* ACSE-TUP Book Series.
37. Lee M. 2004. The molecularisation of taxonomy. *Invertebrate Systematics* 18:1- 6.
38. López-Garcia P., Philippe H., Gail F. & Moreira D. 2003. Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:697-702.
39. Madani M., Subbotin S. & Moens M. 2005. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye. *Molecular and Cellular Probes* 19:81-86.
40. Mallet J. & Willmott K. 2003. Taxonomy: renaissance or Tower of Babel. *Trends in Ecology and Evolution* 18:57-59.
41. McCarter J. 2009. Molecular Approaches Toward Resistance to Plant-Parasitic Nematodes. pp. 239-267. In: *Cell Biology of Plant Nematode Parasitism*. Springer Berlin Heidelberg.
42. Mekete T., Grey M. & Niblack T. 2009. Distribution, morphological description, and molecular characterization of *Xiphinema* and *Longidorus* spp. associated with plants (*Miscanthus* spp. And *Panicum virgatum*) used for biofuels. *GCB Bioenergy* 1:257-266.
43. Nadler S., De Ley P., Mundo-Ocampo M., Smythe A., Stock S., Bumbarger D., Adams B., De Ley I., Holovachov O. & Baldwin J. 2006. Phylogeny of Cephalobina (Nematoda): Molecular evidence for recurrent evolution of problem and incongruence with traditional classifications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:696-711.
44. Navas A., Castagnone-Sereno P., Blazquez J. & Esperrago G. 2001. Genetic structure and diversity within local populations of *Meloidogyne* (Nematoda: *Meloidogynidae*). *Nematology* 3:243-253.

45. Petersen D., Zijlstra C., Wishart J., Blok V. & Vrain T. 1997. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequence in the ribosomal intergenetic spacer. *Fundamental and Applied Nematology* 20:619-626.
46. Piotte C., Castagnone-Sereno P., Uijthof J., Abad P., Bongiovanni M. & Dalmasso A. 1992. Molecular characterization of species and populations of *Meloidogyne* from various geographic origins with repeated-DNA homologous probes. *Fundamental and Applied Nematology* 15:271- 276.
47. Powers T. 2004. Nematode molecular diagnostics: From Bands to Barcodes. *Annual Review of Phytopathology* 42:367-383.
48. Powers T., Platzer E. & Hyman B. 1986. Species-specific restriction site polymorphism in root-knot nematode mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 18:288-293.
49. Powers T., Todd T., Burnell A., Murray P., Fleming C., Szalanski A., Adams B. & Harris T. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* 29:441-450.
50. Setterquist R., Smith G., Jones R. & Fox G. 1996. Diagnostic probes targeting the major sperm protein gene that may be useful in the molecular identification of nematodes. *Journal of Nematology* 28:414-421.
51. Shi-Bin W., Liang L., Ju W., Yong J. & Si-Wei J. 2008. PCR-DGGE analysis of nematode diversity in Cu-contaminated soil. *Pedosphere* 18:621- 627.
52. Stirling G., Griffin D., Ophel-Keller K., McKay A., Hartley D., Curran J., Stirling A., Monsour C., Winch J. & Hardie B. 2004. Combining an initial risk assessment process with DNA assays to improve prediction of soil borne diseases caused by root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in the Queensland tomato industry. *Australas. Plant Pathology* 33:285-293.
53. Stock S., Campbell J. & Nadler S. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* 87:877-889.
54. Subbotin S., Halford P. & Perry R. 1999. Identification of populations of potato cyst nematodes from Russia using protein electrophoresis, rDNA-RFLP and RAPDS. *Russian Journal of Nematology* 7:57-63.
55. Subbotin S., Sturhan D., Chizhov V., Vovlas N. & Baldwin J. 2006. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology* 8:455-474.
56. Subbotin S., Sturhan D., Vovlas N., Castillo P., Tanyi T., Moens M. & Baldwin J. 2007. Application of the secondary structure model of rRNA for phylogeny: D2-D3 expansion

- segments of the LSU gene of plantparasitic nematodes from the family *Hoplolaimidae* Filipjev, 1934. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43:881-890.
57. Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R. & Vogler A. 2002. DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature* 418: 479-479.
58. Uehara T., Mizukubo T., Kushida A. & Momota Y. 1998. Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* 44:357-368.
59. Waeyenberge L., Ryss A., Moens M., Pinochet J. & Vrain T. 2000. Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. *Nematology* 2:135-142.
60. Waite I., O'Donnell A., Harrison A., Davies J., Colvan S., Ekschmitt K., Dogan H., Wolters V., Bongers T., Bongers M., Bakonyi G., Nagy P., Papatheodorou E., Stamou G. & Bostrom S. 2003. Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of soil community DNA. *Soil Biology and Biochemistry* 35:165-173.
61. Xue B., Baillie D., Beckenbach K. & Webster J. 1992. DNA hybridization probes for studying the affinities of three *Meloidogyne* populations. *Fundamental and Applied Journal of Nematology* 15:35-41.
62. Zijlstra C., Donkers-Venne D. & Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2:847-853.