

FOL
3751



EMBRAPA

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA



NOÇÕES BÁSICAS DE NEMATOLOGIA

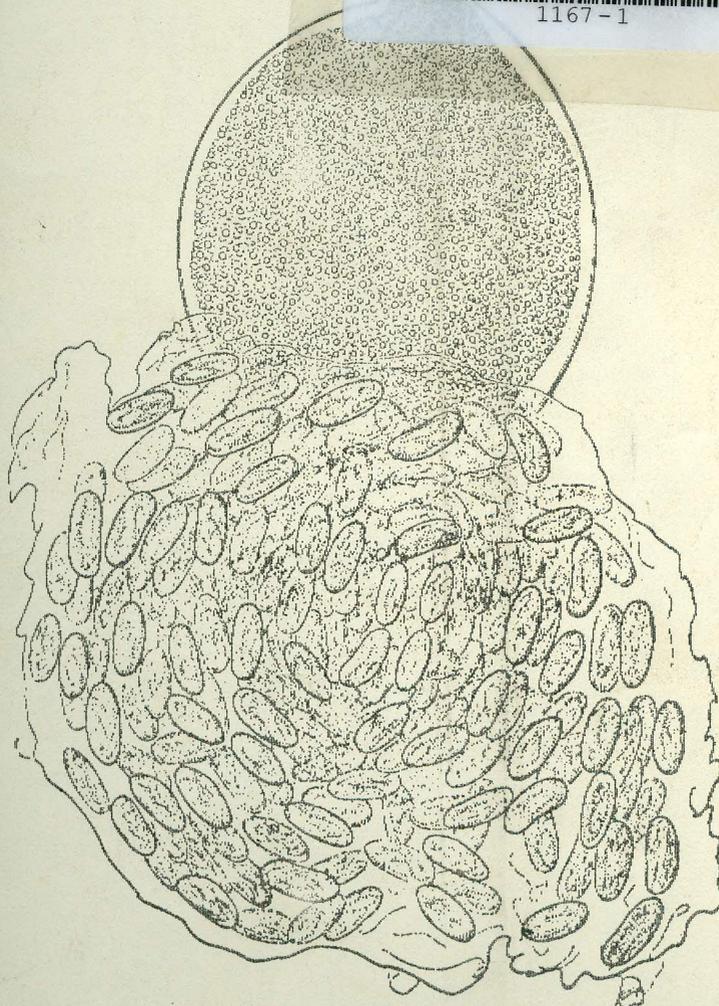
Nocoos basicas de nematologia.

1978

FL - 3751



1167-1



APOSTILA PREPARADA POR : O.M.SILVA

TEC.LABORATÓRIO I-C.N.P.Soja

LONDRINA-1978



C O N T E Ú D O

ORGANIZAÇÃO DOS NEMATÓIDES	01
Forma do corpo	01
Parededo corpo	01
Aparelho digestivo	03
Aparelho respiratório	06
Aparelho circulatório	06
Sistema nervoso	06
Orgãos sensoriais	07
Sistema excretor	07
Reprodução	08
Aparelho reprodutor da fêmea	08
Aparelho reprodutor do macho	09
Composição química	10
ASPECTOS BIOLÓGICOS	10
Súmula biológica	10
Dormência	11
Papel dos nematóides como parte do complexo biótico do solo	12
Modalidade de parasitismo em plantas	12
Ação dos nematóides sobre as plantas hospedeiras	13
Sintoma das doenças causados por nematóides	13
Sintomas gerais no campo	14
Sintomas nas plantas atacadas	14
Alguns fatores dos quais dependem a atividades dos nematóides	15
NEMATÓIDES CAUSADORES DE GALHAS	15
Biologia	16
Sintomatologia	17
Disseminação	18
Plantas hospedeiras	19
Controle	19
Fases do ciclo de vida	20
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MELOIDOGYNE	21
Teste do hospedeiro diferencial Carolina do Norte	21
Padronização do teste do hospedeiro	25

Identificação ao microscópio	26
Testes de resistência	29
Anatomia dos nematóides do gênero <u>Meloidogyne</u>	30
INSTRUÇÕES PARA COLETA, EMBALAGEM E ENVIO DE AMOSTRAS DE SOLO E RAÍZES DE SOJA PARA IDENTIFICAÇÃO DE NEMATÓIDES . . .	31
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE NEMATÓIDES DO SOLO E DOS TECIDOS DE PLANTAS	33
Métodos de separar nematóides do solo	34
Métodos de separar nematóides dos tecidos de plantas . .	36
Isolamento de ovos de nematóides do solo e tecidos de plantas	37
Coloração de nematóides "in situ" em tecidos de plantas .	38
Métodos de fixar nematóides em lâminas permanentes . . .	38
BIBLIOGRAFIA	40

ORGANIZAÇÃO DOS NEMATÓIDES

FORMA DO CORPO - Os nematóides são animais tipicamente fusiformes, isto é, alongados e afilando-se para as extremidades. O comprimento das espécies do solo varia de 0,5 a 4mm e a largura de 50 à 250 micros.

No caso das fêmeas de espécies de certos gêneros parasitos de vegetais, tais como Meloidogyne e Heterodera, durante o seu desenvolvimento ocorre um notável aumento da largura, resultando nematóides com forma aberrante, de limão, periformes etc. Estas fêmeas são incapazes de se locomover, vivendo como parasitas.

A cavidade do corpo dos nematóides, não sendo revestida de tecido epitelial, é referida como pseudoceloma. Este é cheio de um líquido (fluido pseudocelômico) e tecido fibroso, no qual se notam grandes células conhecidas como pseudocelomócitos.

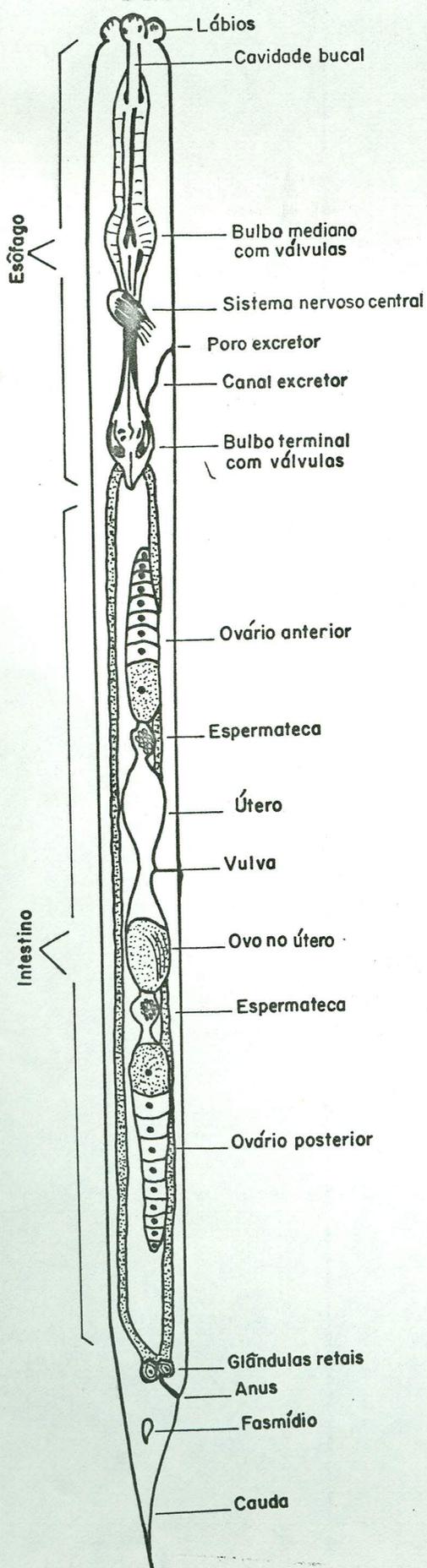
PAREDE DO CORPO - O corpo dos nematóides possui um revestimento não celular, elástico, formado de um complexo de substâncias máxime protéicas, denominado cutícula. Esta é geralmente transparente, podendo, porém, apresentar-se amarelada ou brancacenta. A coloração, às vezes, apresentada por certos nematóides, resulta de substâncias coloridas presentes no intestino, ingeridas pelos mesmos.

Além de recobrir o corpo, a cutícula penetra pelas aberturas, revestindo a cavidade bucal, esôfago, reto, vagina, poro excretor e certos órgãos sensoriais.

A cutícula pode ser lisa, isto é, destituída de qualquer ríscua ou outra ornamentação. Pode, porém, apresentar-se estriada longitudinal ou transversalmente ou com pontilhações. Em certos gêneros, a estriação transversal se apresenta muito evidente, sendo a cutícula referida como anelada. As estrias ou anéis jamais correspondem a septos internos, uma vez que os nematóides têm o corpo indiviso. Expansões logitudinais da cutícula são referidas como asas. Os machos, em certos gêneros, apresentam asas na região caudal, relacionadas com o processo de cópula, constituindo a bursa.

A cutícula assenta-se sobre a hipoderme, a qual pode se apresentar formada de células distintas ou constituindo um sincí





cio. A hipoderme exibe quatro espessamentos, formando as cordas longitudinais: uma dorsal, outra ventral e duas laterais. As cordas laterais geralmente são mais desenvolvidas e podem mostrar células glandulares abrindo-se no exterior através de poros localizados na cutícula. Células de mesmo tipo podem ocorrer na região caudal, as quais se abrem no exterior por um poro de localização terminal, referido como "spinneret".

As cordas laterais são de demarcadas externamente na cutícula, aí constituindo os campos laterais, que os autores costumam figurar nas suas descrições de espécies, pelo interesse que apresentam.

O tecido hipodermal, entre as cordas, é destituído de núcleos. Nas cordas, o tecido se apresenta complexo, contendo inúmeros núcleos mitocôndrios, grânulos de glicogênio, substância graxa etc.

A cutícula apresenta-se um tanto complexa, sendo constituída por um certo número de camadas, variável segundo o gênero a que pertence o nematóide, se larva ou adulto, bem ainda de acordo com a região do corpo considerada (HIRSCHMANN, 1971).

A musculatura somática dos nematóides é formada de grandes células, muito características, constituídas de uma parte provi

da de fitas contráteis e de outra, que contém o núcleo, destituída desses elementos. Essas células dispõem-se em camada simples, ao longo de seu comprimento, sob a hipoderme, nos espaços existentes, entre as cordas longitudinais. Há, pois, quatro campos de músculos.

Quando há poucas células em um dado campo, o nematóide é denominado meromiário; quando existem muitas células por campo, recebe o nome de polimiário. O tipo de célula permite reconhecer: a) nematóide platimiário, quando as fitas contráteis se dispõem apenas na parte da célula que mantém contacto com a hipoderme; b) nematóides celomiário, quando as fitas se estendem também dos lados da célula.

Há nematóides que não apresentam cordas longitudinais ou apresentam somente duas cordas. Nestes casos, a camada muscular ou é contínua ou se apresenta dividida em apenas dois campos. Os dois tipos são conhecidos como holomiários.

Muito característica das células musculares dos nematóides é a relação que mantêm com os nervos das cordas longitudinais, por meio de prolongamentos de sua parte sarcoplásmica, denominados processos de enervação.

Além da musculatura descrita, existem nos nematóides músculos com funções especiais. Nos machos, por exemplo, podem existir músculos transversais, em número variável, estendendo-se das cordas laterais até a parte ventral do corpo, denominados músculos copuladores; ao nível do ânus, aparece um músculo em forma de H, com a função de dilatar o reto e, dessa forma permitir a defecação, conhecido como depressor ani etc.

APARELHO DIGESTIVO - A abertura oral localiza-se na extremidade anterior, sendo rodeada por lábios. No geral existem seis lábios, sendo dois laterais, dois subventrais e dois subdorsais. Em muitos gêneros, ocorreu fusão de lábios, aos pares, reduzindo, então, o número para três; em outros a fusão foi total, resultando um extremo anterior liso, no qual não mais se pode delimitar lábios.

Em certos gêneros, os lábios foram substituídos por estruturas denominadas probolae. Em Acrobeles, por exemplo, tais probolae são muito evidentes.

A abertura oral dá entrada à cavidade bucal ou estoma, cuja forma varia grandemente, podendo ser cilíndrica, mais ou menos

ampla, provida ou não de dentes ou dentículos etc. A cavidade bucal pode não existir, sendo substituída por um órgão denominado estilete. Este pode ser projetado para o exterior e depois recolhido, sendo acionado por músculos especiais. Costuma-se com parar o estilete a uma agulha de injeção, por ser provido de canal interno, por onde passam líquidos. Todos os nematóides parasitos de plantas possuem um estilete.

Tipicamente, o estilete consiste em três partes, isto é, uma parte anterior cônica, uma haste cilíndrica mediana e três dilatações basais denominadas bulbos, sendo um dorsal e dois subventrais. Aos bulbos vem se prender a musculatura encarregada da movimentação do estilete em direção ao exterior. Tais músculos prendem-se anteriormente, à base da moldura esclerosada cefálica ou à parede do corpo ou à ambas. O estilete apresenta numerosas variações, nos diferentes gêneros de nematóides parasitos de vegetais, apresentando-se ora como um órgão delicado, destituído de bulbos basais, ora como um órgão altamente esclerosado, forte, provido de bulbos grandes. Em certos gêneros, os machos podem não ter estilete, aparentemente não se alimentando. Formas larvais, porém, são sempre providas desse órgão.

O estilete é mantido em sua posição por meio de um complexo aparelho guia; este se estende da base do esqueleto cefálico aos bulbos basais do estilete.

Quando estilete se apresenta com a ponta cortada em bisel, a linha oblíqua se denomina abertura.

À cavidade bucal segue-se o esôfago, que é um órgão musculoso e glandular. Existem usualmente três glândulas, unicelulares, embutidas na parede esofagiana: uma dorsal e duas subventrais, cujos condutos se abrem no canal esofagiano. A luz do esôfago é trirradiada, sendo esta uma característica dos nematóides.

A constituição do esôfago varia grandemente nos diferentes grupos de nematóides.

Ao fitonematologista interessa conhecer as modificações sofridas pelo esôfago, em que a cavidade bucal é substituída por um estilete, que pode ser resultante da transformação de toda a cavidade bucal, sendo então denominado estomatostílio, ou ser resultante da transformação de apenas um dente (odontostílio).

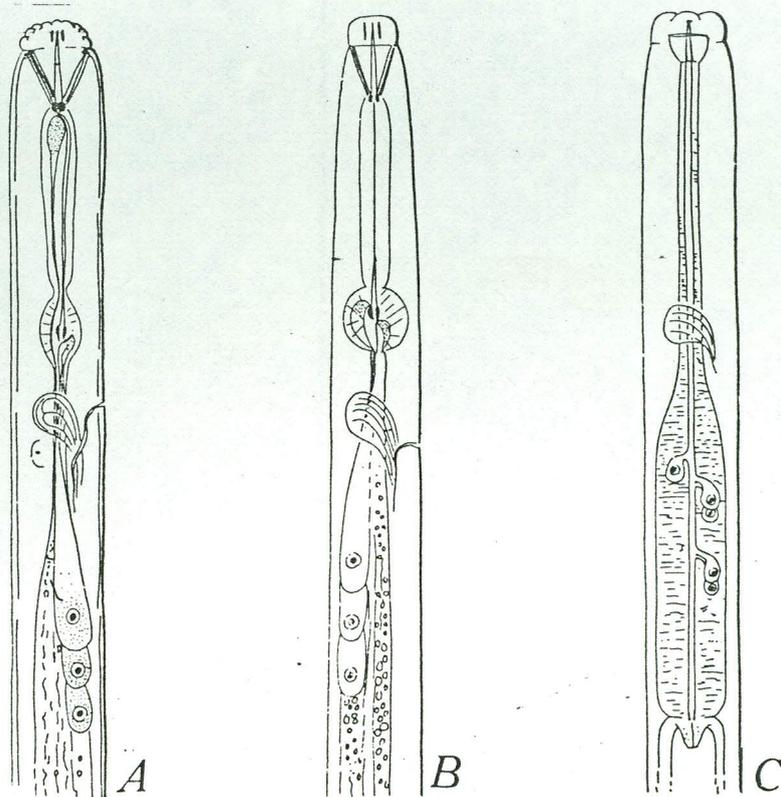
Existem três tipos fundamentais de esôfago entre os nematóides portadores de estilete, os quais são denominados segundo os grupos sistemáticos que caracterizam tal, como segue:

a) Tipo tilencóide - Neste tipo, característico da superfamília Tylenchoidea, o conduto da glândula dorsal abre-se, no canal do esôfago, na altura do procorpo, ou seja, nas proximidades do estilete. Este é um estomatostílio. Nos mais importantes gêneros dotados deste tipo de esôfago, o bulbo terminal desapareceu e o istmo, conseqüentemente, passou a se unir diretamente com o intestino. As glândulas esofagianas passaram a constituir um lobo caindo sobre o começo do intestino, recobrando-o. Em um certo número de gêneros, contudo, permaneceu o bulbo terminal, em cujos tecidos se conservam, embutidas, as glândulas esofagianas.

b) Tipo afelencóide - Aqui, o conduto da glândula dorsal une-se com o canal do esôfago ao nível do metacorpo ou bulbo mediano. O bulbo terminal desapareceu nos gêneros mais importantes, apresentando-se as glândulas esofagianas tais como em tilencóide. Este tipo caracteriza os nematóides da superfamília Aphelenchoidea. O estilete constitui um estomatostílio.

c) Tipo dorilaimóide - Característico da superfamília Dorylaimoidea, este tipo difere bastante dos anteriores, a começar pelo estilete, que é um odontostílio. Apresenta-se formado de duas partes, uma anterior, de menor diâmetro e outra basal, alargada, cilíndrica e muito musculosa, a qual contém as glândulas esofagianas. Destas glândulas, em exemplares fixados no geral se pode divisar apenas os núcleos. Ao esôfago, segue-se o intestino, o qual se apresenta como um tubo cuja parede é formada de uma só camada de células epiteliais. À conexão dos dois órgãos, existe um aparelho valvular chamada válvula esôfago-intestinal, que por vezes se projeta para o interior da luz do intestino, frequentemente como um corpo cônico, sendo, então, referido como cárdia. Ao se aproximar da extremidade posterior, o intestino sofre uma constrição e, desse ponto até abrir-se no ânus, recebe o nome de reto. Usualmente, observam-se glândulas retais, uma de posição dorsal e duas subventrais, abrindo-se todas no reto. Em certos nematóides, o reto é precedido por uma porção intestinal de estrutura diferenciada do restante que, por isso, se denomina pré-reto.

A superfície livre das células intestinais exhibe projeções protoplasmáticas para a luz do órgão, chamadas microvilosidades, as quais aumentam grandemente a área de absorção do órgão. Nematóides existem cujo intestino não apresenta uma luz definida.



ESQUEMA DO ESÔFAGO DE NEMATÓIDES PROVIDOS DE ESTILETE
(seg. STEINER, 1951)

- A - tipo tilencóide
- B - tipo afelencóide
- C - tipo dorilaimóide

APARELHO RESPIRATÓRIO . Não existe nos nematóides nenhum órgão respiratório especial. As trocas de gases dão-se por difusão da parede do corpo.

APARELHO CIRCULATÓRIO - Não existe no organismo dos nematóides nenhum órgão pertinente a este aparelho.

SISTEMA NERVOSO - Um anel de fibras nervosas rodeando o esôfago, geralmente à altura do istmo, e diversos glânglios associados formam o órgão nervoso central dos nematóides. Nervos longitudinais procedentes do anel nervoso dirigem-se para as duas extremidades do corpo. Para a região anterior, dirigem-se seis nervos destinados às papilas e dois aos anfídios. Para a extremida

de posterior, correm geralmente um par dorsal, um ventral, quatro submedianos e dois ou três pares de nervos laterais. Todos estes nervos localizam-se na hipoderme, existindo comissuras entre os mesmos.

ÓRGÃOS SENSORIAIS - Os órgãos sensoriais mais notáveis geralmente descritos para os nematóides são os seguintes:

a) Anfídios - Receptores de estímulos químicos, localizados na extremidade anterior, um em cada lado, abrindo-se no exterior por meio de aberturas com formas muito variadas nos diferentes grupos de nematóides.

b) Papilas cefálicas - Diminutas elevações existentes nos lábios, que recebem terminações dos nervos papilares, constituindo órgãos tácteis. Quando são órgãos longos, igualmente enervados, são chamados setas.

c) Deirídios - São papilas grandes, localizadas nos campos laterais, uma de cada lado do corpo, ao nível do anel nervoso. Admite-se serem órgãos tácteis.

d) Hemizonídios - Estrutura de forma biconvexa, muito refringente, localizada nas proximidades do poro excretor e unida por fibras nervosas ao anel perisofágico.

e) Fasmídios - Órgãos pares, laterais, localizados na região posterior. Aparecem externamente nos campos laterais, ou como diminutos poros ou como grandes placas, sendo, no último caso, denominados escutelos. Em certos nematóides, verifica-se a presença de uma célula glandular associada a cada um destes órgãos.

f) Órgãos suplementares ou suplementos - Nos machos de certos nematóides aparecem estes órgãos, na linha ventral, os quais devem funcionar como órgãos tácteis durante a cópula. Ora se apresentam como simples papilas, ora como órgãos glandulares.

SISTEMA EXCRETOR - Muitos nematóides apresentam, na linha ventral, um minúsculo orifício, conhecido como poro excretor. Noutros nematóides tal poro não foi jamais divisado, sendo considerado inexistente, pouco ou nada se sabendo, sobre o seu sistema excretor. Aliás, entre nematóides, nenhum outro sistema apresenta maior número de variações do que este.

Uma característica do sistema excretor dos nematóides é a absoluta ausência de células flamas, particularidade esta apro

veitada para diferenciá-los dos outros grupos de animais comumente referidos como Aschelminthes.

REPRODUÇÃO - Entre os nematóides, os sexos são geralmente separados. Os machos são prontamente reconhecidos pela posse de órgãos de cópula, tais como espículos, asas caudais, papilas especiais etc. No mais, frequentemente são menores que as fêmeas. Em alguns gêneros de nematóides parasitos de plantas, ocorre forte dimorfismo sexual, sendo as fêmeas globosas, piriformes etc., e os machos apresentando a forma alongada usual.

Em populações de certas espécies, machos e fêmeas podem ocorrer em igual número. Noutras espécies, contudo, os machos podem ser pouco numerosos, mesmo raros, não tendo, em muitos casos, jamais sido vistos, certamente não existindo. Verifica-se, aqui, reprodução sem concurso de machos, sendo conhecidas formas partenogênicas e formas hermafroditas. Na partenogênese, os ovos se desenvolvem sem serem fertilizados. Nas espécies hermafroditas, espermatozoides e óvulos formam-se nas gônadas do mesmo indivíduo. Na maior parte dos casos, as gônadas primeiro produzem espermatozoides, os quais são conservados para posterior fertilização dos ovos produzidos pela mesma gônada (hermafroditismo protândrico).

APARELHO REPRODUTOR DA FÊMEA - Consta das seguintes partes: ovário, oviduto, útero, vagina e vulva.

O ovário é um tubo cego, em cujo interior se dá a ovogênese. As fêmeas podem apresentar um ou dois ovários, sendo denominadas, respectivamente, monodelfas e didelfas. Quando o ovário único se estende anteriormente em relação à vulva, a fêmea denomina-se prodelfa; a fêmea é opistodelfa quando o tubo ovariano é posterior. Entre os nematóides de vida livre ou parasitos de plantas didelfos, os dois ovários geralmente se apresentam opostos, isto é, dispõem-se um anteriormente e outro posteriormente em relação à vulva sendo, por isso, referidos como anfidelfos.

A zona inicial do ovário, correspondendo ao fundo do tubo cego, onde na maioria dos nematóides têm origem os oócitos, chama-se zona germinal ou zona de multiplicação (nematóides telogônicos).

Em alguns nematóides parasitos de animais, porém, as células germinativas formam-se ao longo de todo o comprimento da gônada (nematóides hologônicos).

Nos nematóides parasitos verifica-se um aumento no tamanho de todo o aparelho reprodutor. Os úteros e a zona de crescimento dos ovários se apresentam especialmente mais desenvolvidas, resultando em maior produção de ovos.

Ao ovário, segue-se o oviduto, o qual se une com o útero. O oviduto é um tubo estreito e de comprimento variável. Ao nível da união dos dois últimos órgãos, pode o oviduto alargar-se, formando uma espermateca de forma variável, onde armazenam espermatozoides. O útero é um amplo tubo, de paredes delicadas, no qual os ovos permanecem até serem lançados ao exterior. Durante a permanência nesse órgão, os ovos adquirem o seu revestimento protéico externo e passam ao menos por parte de seu desenvolvimento embrionário.

Quando a fêmea é monodelfa, pode o útero estender-se do lado oposto ao que apresenta o ovário, formando um saco uterino. Este pode servir como órgão de armazenamento de espermatozoides.

Os úteros ligam-se com uma vagina, geralmente curta e provida de músculos, que se abre no exterior pela vulva ou abertura genital feminina. Uma musculatura especial produz a dilatação da vulva no momento da passagem dos ovos.

A posição da vulva varia nos diferentes gêneros de nematóides parasitos de plantas, sendo expressa pelo valor V . Quando se diz $V = 50\%$, a vulva localiza-se exatamente ao nível do meio do corpo; quando o valor V é menor que 50% , a vulva é anterior ao meio; se V é maior que 50% , a vulva situa-se posteriormente ao meio do corpo.

Os ovos de nematóides costumam apresentar três envoltórios distintos a saber: um revestimento protéico secretado por células da parede uterina, uma casca quitinosa e uma membrana lipóide. Os dois últimos envoltórios são produzidos pela própria célula-ovo. Nos ovos dos nematóides parasitos de plantas, geralmente não existe o revestimento protéico exterior.

Os ovos são geralmente ovais, arredondados, elípticos, reniformes etc. No caso dos nematóides de vida livre, podem apresentar expansões, tais como espinhos, ganchos, etc.

APARELHO REPRODUTOR DO MACHO - Existe uma grande analogia entre os ovários e os testículos, pois estes também se apresentam como tubos cegos, nos quais também se pode reconhecer uma zona de multiplicação ou germinativa, onde têm origem os espermátogônios e

uma zona de crescimento, onde os mesmos se desenvolvem. Quando o testículo é muito longo, pode apresentar uma ou mais reflexões, a fim de se conter no corpo. O testículo continua-se pelo vaso deferente, o qual se estreita e, com o nome de canal ejaculador, abre-se no reto. Os machos dos nematóides são, pois, providos de cloaca.

Os espermatozóides são armazenados em uma parte dilatada, denominada vesícula seminal, que separa o vaso deferente da região de crescimento do testículo.

Os espermatozóides são células arredondadas, ou alongadas, amebóides, locomovendo-se por meio de pseudópodes.

Espermatozóides contidos no vaso deferente se apresentam morfologicamente diferentes quando contidos na espermateca da fêmea, indicando que os gametas continuam se diferenciando depois da passagem para o corpo feminino pela cópula (HIRSCHMANN, 1971).

Os machos podem ser monórquicos ou diórquios, segundo apresentam um ou dois testículos respectivamente.

Como órgãos de cópula, os machos apresentam dois órgãos esclerosados, mais ou menos arqueados, com dimensões muito variáveis, chamados espículos. Em muitos grupos de nematóides, existe uma peça acessória, localizada sob os espículos, chamada gubernáculo. A cutícula na região caudal dos machos pode expandir-se formando asas caudais, providas de um número variável de papilas genitais.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA - A composição química dos nematóides parasitos de plantas está ainda pouco estudada. Neste campo, os autores têm trabalhado principalmente com espécies nocivas aos animais que, em consequência, são melhor conhecidas do ponto de vista em apreço.

ASPECTOS BIOLÓGICOS

SÚMULA BIOLÓGICA - Os ovos dos nematóides, ao serem depositados pelas fêmeas, podem apresentar-se sem qualquer indício de segmentação ou mostrar-se em uma fase mais ou menos avançada do processo embriogênico. Quando, ao serem eliminados, os ovos já contêm larvas completamente formadas e movendo-se no seu interior, a espécie é referida como ovovivípara.

O termo larva é empregado para designar os nematóides jovens, os quais apresentam todos os órgãos dos adultos, exceto órgãos reprodutores. Trata-se de uma designação seguramente inadequada, uma vez que se aplica a animais imaturos que em tudo se assemelham aos adultos, diferindo apenas por não possuírem o aparelho reprodutor formado. Este é geralmente representado por apenas algumas células, as quais, em conjunto, constituem o primordium genitale.

Entretanto, embora impróprio, o uso do termo generalizou-se entre os nematologistas, desde os mais antigos, sendo por isso mantido.

Durante o desenvolvimento da larva, dão-se quatro trocas de cutícula ou ecdises, sendo os períodos entre duas trocas seguidas referidos como fases ou estádios larvais. Com a quarta ecdise, termina o quarto estágio larval, ingressando o nematóide na fase adulta.

Em certos gêneros, a primeira ecdise tem lugar quando a larva ainda se acha dentro do ovo, antes, pois, da sua eclosão. Nestes casos, o exame de ovos contendo larvas prestes a eclodir permite divisar, em seu interior, restos da cutícula abandonada por ocasião da primeira ecdise, já ocorrida. A velha cutícula geralmente é abandonada. Há, porém, gêneros em que ela permanece envolvendo o exemplar, pelo menos durante um certo tempo. Ao se liberar da cutícula, uma nova já se acha sob a mesma, perfeitamente formada, tendo sido produzida pela hipoderme.

Durante a vida larvária, os nematóides geralmente apenas aumentam de tamanho e os órgãos reprodutores se desenvolvem. Em certos gêneros de nematóides parasitos de plantas, as fêmeas, durante o seu desenvolvimento, perdem a forma alongada típica e adquirem formas aberrantes, de pêra, limão etc.

DORMÊNCIA - Uma das características mais notáveis de certos nematóides, parasitos principalmente de órgãos aéreos, reside em sua capacidade em passar a um estado especial denominado dormência e, assim, se conservar vivos durante longos períodos desfavoráveis. Em dormência, apresentam-se os exemplares em completa inatividade e o metabolismo se mantém muito baixo. O período durante o qual os exemplares assim se conservam depende das suas reservas de nutrientes e da severidade das condições ambientais.

Sabe-se que os nematóides dos grãos do trigo (Anguina Triti

ci) podem se conservar, nas sementes, vivos, por um período de até 30 anos (FIELDING, 1951). STEINER & ALBIN (1946), examinando plantas de centeio mantidas em um herbário por 39 anos, puderam obter, do caule, cinco exemplares, vivos, do nematóide Tylenchus polyhypnus. Esses autores estabeleceram, assim, o mais longo período de vida dormente observado entre nematóides.

Apenas nas regiões tropicais e nas casas de vegetação podem os nematóides se desenvolver e reproduzir durante o ano todo. Nas áreas onde duas culturas são separadas por um período de forte frio ou seca, os exemplares apenas sobrevivem por passarem à vida dormente.

PAPÉL DOS NEMATÓIDES COMO PARTE DO COMPLEXO BIÓTICO DO SOLO - Os seres vivos que habitam o solo constituem, em conjunto, o seu complexo biótico. Este é formado de uma parte vegetal, dada por bactérias, fungos, algas, etc; e outra animal, representada por protozoários e metazoários de vários grupos, tais como nematóides, anelídios, rotíferos, tardígrados, artrópodos.

Sabe-se que em um metro quadrado da superfície, até à profundidade de 15cm., podem ocorrer muitos milhões de nematóides. Desta forma, estes animais podem constituir 98% ou mais da fração de metazoários dos solos.

MODALIDADES DE PARASITISMO EM PLANTAS - Os nematóides parasitos podem penetrar no organismo vegetal, sendo designados endoparasitos. Por outro lado, podem parasitar do lado de fora, introduzindo na planta apenas o estilete e parte do peçoço, constituindo-se em ectoparasitos. Não é possível, contudo, separar as espécies de nematóides nos dois grupos, de uma forma rigorosa. É que uma dada espécie pode comportar-se das duas formas em diferentes períodos de seu ciclo ou em plantas diferentes. Os nematóides causadores de galhas do gênero Meloidogyne, por exemplo, são primariamente endoparasitos; as suas larvas, contudo, alimentam-se das células da superfície da raiz antes de penetrá-la, atuando, pois, inicialmente, como ectoparasitos. Certos nematóides espiralados do gênero Helicotylenchus comportam-se principalmente como ectoparasitos mas, em determinadas plantas são surpreendidos no interior dos tecidos, agindo, pois, como parasitos internos.

Os nematóides endoparasitos podem penetrar no vegetal na fa

se de larvas e dele não mais sair, instalando-se definitivamente nos tecidos, sendo, pois, parasitos sedentários. Outros nematôides penetram no vegetal e o abandonam, voltando ao solo, no caso de as condições ali reinantes se tornarem, por qualquer motivo, desfavoráveis. Atuam, pois, como parasitos migradores. Os nematôides das galhas do gênero Meloidogyne e os nematôides do gênero Pratylenchus exemplificam os dois casos respectivamente.

Os ectoparasitos comportam a mesma classificação em sedentários e migradores. O nematôide dos citros (Tylenchulus semipenetrans) exemplifica o primeiro tipo (sedentário) e os espiralados (fam. Hoplolaimidae) o segundo (migradores).

Todas as partes das plantas podem ser invadidas por nematôides, tais como raízes, tubérculos, caules aéreos, folhas, flores e sementes. Os ataques às raízes e a outras estruturas subterrâneas são, porém os mais frequentes e os mais importantes.

AÇÃO DOS NEMATÓIDES SOBRE AS PLANTAS HOSPEDEIRAS - A ação dos nematôides sobre as plantas hospedeiras se manifesta de três maneiras: ação traumática, ação espoliadora e ação tóxica. As três maneiras podem ou não se manifestar simultaneamente.

A ação traumática advém das injúrias mecânicas resultantes da movimentação que certos nematôides realizam dentro do vegetal, através dos seus tecidos. No caso dos nematôides do gênero Pratylenchus, esta ação pode ser importante. Noutros gêneros, parece ser mínima.

A ação espoliadora das substâncias nutritivas que são desviadas para o sustento do organismo do nematôide parasito.

A maior parte dos prejuízos causados às plantas provem das reações às substâncias libertadas no organismo do vegetal pelo parasito. Essas substâncias são secretadas pelas glândulas esofagianas dos nematôides, também conhecidas como glândulas salivares. Trata-se, pois, de ação tóxica.

SINTOMATOLOGIA DAS DOENÇAS CAUSADAS POR NEMATÓIDES - Antes de tratar dos sintomas apresentados pelas plantas infestadas, será preciso lembrar que os nematôides podem ser migradores e, dessa forma, podem ser observados sintomas quando os mesmos já não mais se acham presentes no material ou apenas nele ocorrem em pequeno número, tendo migrado para o solo. É o que acontece, por exemplo, em plantas atacadas por nematôides do gênero Pratylen

chus.

Por outro lado, há casos com inexistência de sintomas. Tubérculos de batatinha, por exemplo, atacados pelo nematóide dourado, apresentam-se sadios, não exibindo qualquer anormalidade. Isto fez com que o mal fosse inicialmente relacionado a deficiência de substâncias minerais do solo, constituindo um dos muitos casos em que uma infestação por nematóides recebeu interpretação errônea.

Os sintomas exibidos pelas partes aéreas são, em essência, os mesmos resultantes de todas as condições que impedem que as plantas desenvolvam um sistema radicular sadio. As plantas atacadas perdem vigor, agindo os nematóides como um fator de enfraquecimento.

Está hoje demonstrado que as plantas possuem piores condições para suportar períodos desfavoráveis, decorrentes por exemplo de seca ou frio. Isto quer dizer que em períodos secos ou frio intenso as plantas atacadas sucumbem em muito maior número do que as livres de infestação.

Vamos a seguir, alistar os principais sintomas geralmente apresentados pelas plantas.

SINTOMAS GERAIS NO CAMPO:

- a) Tamanho desigual de plantas.
- b) Murchamento durante a parte mais quente do dia.
- c) Amarelecimento e queda prematura de folhas.
- d) Folhas e frutos pequenos.
- e) Deperecimento ou declínio vagaroso.
- f) Nanismo e entouceramento de plantas.
- g) Sintomas exagerados de deficiência de certos elementos essenciais, em regiões onde o solo é deficiente de tais elementos.
- h) Diminuição na produção.

SINTOMAS NAS PLANTAS ATACADAS:

- a) Sistema radicular muito denso, com formação excessiva de laterais.
- b) Sistema radicular pobre, deficiente.
- c) Formação de galhas em raízes, tubérculos, bulbos, e mesmo órgãos aéreos que estiverem em contacto com o solo etc.
- d) Raízes com forma de dedos (ex.: cenouras atacadas por nematói

- des do gênero Meloidogyne).
- e) Descolamento e quebra do córtex radicular.
 - f) Rachaduras ou "crackings" (ex.: batata-doce rachada, atacada por Meloidogyne incognita).
 - g) Paralisação do crescimento (raízes amputadas) ou morte da ponta das raízes.
 - h) Necrose em órgãos aéreos e subterrâneos.
 - i) Manchas escuras em folhas (ex.: plantas de crisântemo atacadas por Aphelenchoides ritzemabosi), caules, frutos (amendoim atacado por espécies do gênero Pratylenchus) etc.

ALGUNS FATORES DOS QUAIS DEPENDE A ATIVIDADE DOS NEMATÓIDES - Os nematóides parasitos se mantêm no solo por um período variável de seu ciclo. Os ectoparasitos, naturalmente, ali passam toda a sua vida, concentrando-se principalmente na rizosfera. Os endoparasitos penetram no vegetal e, portanto, dispendem no solo uma parte bem mais curta de seu ciclo. Finalmente, os parasitos de órgãos aéreos dispendem uma parte mínima de seu ciclo no solo, já que permanecem no interior dos tecidos hospedador. O agente do "anel vermelho" do coqueiro (Rhadinaphelenchus cocophilus), porém, conseguiu libertar-se definitivamente do solo, pois os nematóides passam de uma planta para outra por meio de insetos.

Os principais problemas resultantes da ação de nematóides referem-se aos parasitos de órgãos subterrâneos, os quais se acham por um tempo mais ou menos longo em contacto com o solo. Portanto, as variações de temperatura e umidade, as características físicas do solo etc., devem influir sobre a atividade desses componentes do "complexo biótico".

NEMATÓIDES CAUSADORES DE GALHAS (GÊNERO MELOIDOGYNE)

O gênero Meloidogyne foi revalidado em 1949, passando a conter os nematóides formadores de galhas que hoje, segundo WHITE HEAD (1968), são representados por mais de duas dezenas de formas distintas. As espécies mais difundidas no País são as seguintes: M. javânica, M. exigua, M. incognita, M. arenária, M. hapla e M. coffeicola.

BIOLOGIA - No interior de uma raiz parasitada pode-se, com facilidade, localizar as fêmeas adultas. Estas são brancacentas, brilhantes, globosas, providas de um pescoço mais ou menos longo segundo a espécie envolvida. O tamanho varia de menos de 0,5mm a mais de 2mm.

Os ovos são depositados pelas fêmeas no interior de uma substância gelatinosa que previamente flui pelo ânus, formando ootecas. Tal substância resulta de atividades secretora de glândulas retais, sendo clara ao ser depositada e escurecendo no exterior, até tornar-se pardo escura, quase negra.

As fêmeas produzem, em média, 400 a 500 ovos cada uma, havendo, porém, registro de fêmea que produziram mais de 2.000 ovos. SAIGUSA (1957) contou 700-800 ovos para cada fêmea de M. incognita e 550-650 para M. hapla.

A deposição dos ovos pode dar-se no interior dos tecidos. Entretanto, em muitos casos, as fêmeas, durante o seu desenvolvimento, rompem o córtex radicular e emergem à superfície da raiz, depositando os ovos no exterior. Nas raízes em que ocorre este tipo de parasitismo observa-se, após lavagem, a presença de manchas escuras salientes, correspondendo cada uma a uma ooteca depositada externamente.

Dos ovos eclodem as larvas migrantes ou infestantes ou ainda pré-parasitas, as quais podem permanecer na mesma planta ou ganhar o exterior. Sendo muito delicadas, podem facilmente sucumbir quando as condições se tornam adversas.

Vagando pelo solo, as larvas se põem em contacto com uma raiz favorável e nela penetram, tornando-se sedentárias.

Ganhando os tecidos, as larvas libertam o produto de suas glândulas esofagianas. Esta secreção tem a propriedade de hipertrofiar as células, convertendo-as em massas protoplasmáticas conhecidas como células gigantes e também como células de néctar, pelo fato de serem secretoras. Da secreção dessas células alimentam-se as larvas durante todo o ciclo, a partir do momento em que penetraram na raiz. Antes da penetração, podem se alimentar de células da epiderme. Logo depois, de se instalar na raiz, as larvas passam a alterar a sua forma, engrossando-se e adquirindo a forma comumente referida como de salsicha (larva parasita). O desenvolvimento prosseguindo, a larva irá finalmente adquirir a forma de pêra das fêmeas, desenvolvendo-se, então, os órgãos sexuais.

As larvas pré-parasitas são larvas de segundo estágio, pois passaram pela primeira ecdise quando ainda se encontravam dentro do ovo. Apresentam 0,4 a 0,5mm de comprimento.

A evolução dos machos é a seguinte: uma larva parasita paralisa o seu desenvolvimento e em seu interior tem início a formação de um macho, que resulta de uma metamorfose da larva. Pelo rompimento da cutícula, o macho liberta-se.

Vê-se, pelo exposto, que os machos parasitam a planta apenas durante uma parte de seu ciclo. Nessa fase parasita, contudo, prejudicam as plantas da mesma forma que as fêmeas, igualmente incitando o aparecimento de galhas. Evidentemente, sua nocividade se faz sentir por um período mais curto que o das fêmeas.

Embora haja evidência de que ocorram cópulas, nenhum autor as observou. Sabe-se, por outro lado, que os machos não são necessários, sendo normal neste gênero de nematóides parasitos de plantas a reprodução sem o concurso dos mesmos (partenogênese).

O tempo que decorre desde a penetração da larva na planta até o momento em que a mesma, convertida em fêmea, deposita os primeiros ovos, está na dependência de alguns fatores. À temperatura variando de 27,5 a 30°C, esse ciclo dá-se em 17 dias. Diminuindo a temperatura, o número de dias aumenta.

Assim, a 24,5°C, o ciclo dá-se entre 21 e 30 dias. À temperaturas mais baixas que 15,5°C, ou mais alta que 33,5°C, as fêmeas não atingem a maturidade, não se realizando o ciclo. Vê-se que se trata de parasitos de climas quentes.

Sabe-se que riqueza em potássio do solo interfere no desenvolvimento de certas espécies do gênero Meloidogyne.

SINTOMATOLOGIA - As plantas infetadas por nematóide do gênero Meloidogyne podem ser referidas como atacadas de meloidoginose.

Trata-se dos nematóides mais bem conhecidos dos agricultores e isso certamente devido às deformações geralmente presentes nos órgãos atacados. Já vimos que essas deformações, conhecidas como galhas, resultam de hipertrofia de células afetadas pela "saliva" produzida pelas glândulas esofagianas das larvas infestantes.

Outros nematóides, pelo fato de as infestações não conduzirem ao aparecimento de galhas, muito frequentemente passam despercebidos dos lavradores, sendo os efeitos de sua presença nas culturas erroneamente atribuídos às mais diversas causas, máxime

deficiências de elementos minerais, pH desfavorável etc.

Porém, as galhas não são os únicos sintomas e há casos de ataques por estes nematóides sem o aparecimento dessas malformações. Cafeeiros atacados por M. exigua, por exemplo, frequentemente não mostram galhas nas raízes. Nas plantas atacadas por M. hapla, observa-se intensa produção de laterais nas imediações da área invadida, resultando um sistema radicular muito denso. Outras espécies determinam grande redução do sistema radicular.

Quando se trata de uma leguminosa, há a possibilidade de os nódulos causados pelas bactérias fixadoras do azoto serem confundidos com galhas. Os nódulos podem ser reconhecidos pela sua consistência esponjosa e localização lateral, podendo ser destacados com facilidades. As galhas resultam do engrossamento da própria raiz, não podendo, evidentemente ser destacadas. Na mais a superfície da galha apresenta consistência igual à da raiz.

Observa-se que a nodulação é sempre reduzida, por vezes ausente, em raízes pesadamente atacadas por estes nematóides.

Outros sintomas das partes subterrâneas das plantas são os seguintes: deslocamento do córtex, paralização do crescimento da ponta da raiz, rachaduras, etc.

No campo podem ser observados: murchamento de plantas durante a parte mais quente do dia, declínio vagaroso, queda prematura de folhas, queda na produção, sintomas de deficiências de minerais etc.

DISSEMINAÇÃO - A disseminação natural de nematóides do gênero Meloidogyne se faz pelas larvas pré-parasitas, as quais caminham no solo. Entretanto, sabe-se que progridem no solo, em linha reta, apenas cerca de um centímetro por dia, ou 30cm por mês. A capacidade de expansão das larvas é, pois, bastante reduzida.

A difusão não só destes como de outros nematóides se faz pela intervenção de certos agentes de disseminação, resultantes das atividades agrícolas humanas, tais como: a) material vegetal destinado ao plantio, como bulbos, tubérculos, rizomas, etc.; b) mudas enraizadas produzidas em viveiros infestados; c) solo aderente às ferramentas e máquinas agrícolas, pés de animais etc., o qual pode conter ootecas do nematóide; d) enxurradas e água de irrigação, quando o sistema usado permite à água passar de uma para outra gleba; e) excremento de animais (mamíferos) etc.

Quanto ao tipo de solo, os solos soltos, arenosos, são con-

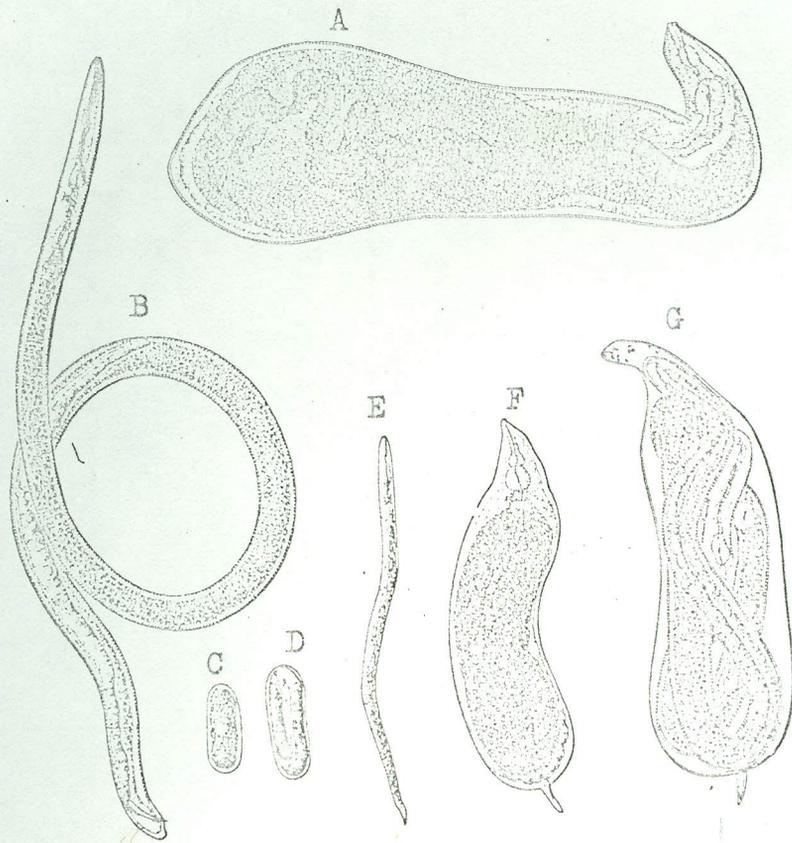
siderados os mais favoráveis aos nematóides, permitindo mais ampla movimentação das larvas pré-parasitas. Porém, infestações podem ocorrer em outros tipos de solo, sendo desfavoráveis apenas os terrenos muito úmidos ou excessivamente compactos.

PLANTAS HOSPEDEIRAS - Contam-se às centenas as plantas hospedeiras dos nematóides deste gênero. Entre elas estão as nossas culturas mais importante, a começar pelo cafeeiro que, em nosso País, é prejudicado por três espécies distintas, ou seja, M. exigua, M. coffeicola e M. incognita.

Dentre as plantas hospedeiras de uma dada espécie, algumas podem não ser altamente susceptíveis, não sendo, por isso, muito prejudicadas. Por outro lado, há plantas que se apresentam muito susceptíveis a uma ou mais espécies do gênero, sendo resistentes às demais. O algodoeiro, por exemplo, é atacado por M. incognita, sendo mais ou menos resistente aos ataques das demais espécies.

CONTROLE - As principais medidas de controle da meloidoginose que têm sido propostas pelos especialistas são as seguintes:

- a) Emprego da "Crotalaria spectabilis";
- b) Inundação do solo;
- c) Culturas armadilhas;
- d) Rotação de culturas;
- e) Variedades resistentes;
- f) Revolvimento do solo;
- g) Controle químico.



FASES DO CICLO DE UM NEMATÓIDE DO GÊNERO
MELOIDOGYNE

- A - Fêmea jovem
- B - Macho
- C - Ovo
- D - Ovo encerrando larva
- E - Larva pré-parasita
- F - Larva parasita
- G - Macho encerrado na cutícula da larva parasita

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MELOIDOGYNE

I. TESTE DO HOSPEDEIRO DIFERENCIAL - CAROLINA DO NORTE:

A. Introdução:

O Teste do Hospedeiro diferencial da Carolina do Norte foi criado para identificar as espécies de Meloidogyne mais amplamente distribuídas como: M. incognita (4 raças), M. arenaria (2 raças), M. javanica e M. hapla. Pode ser usado em levantamentos com um teste para cada nova população encontrada e é especialmente útil para a identificação de populações provenientes de novas localidades ou novos hospedeiros no território abrangido pelo levantamento.

B. Procedimento:

1. Colete amostras de solo de um campo infestado com Meloidogyne.
 - a. Se o campo não estiver plantado, a amostra deverá ser coletada nas linhas onde haviam plantas na safra anterior.
 - b. Se o campo estiver plantado, tome a amostra coletando solo e raízes com o maior número de galhas possível.
 - c. Uma amostra pode ser constituída apenas de raízes com galhas. A amostra deve ser composta de no mínimo 1000 centímetros cúbicos de solo ou 500 gramas de raízes, provenientes de pelo menos 5 pontos no campo.
2. Divida a amostra e use para inocular 8 ou mais vasos. Os vasos devem conter 1000cc de solo arenoso ou solo misturado com areia (nota: substitua por sacos plásticos ou latas finas se não tiver vasos disponíveis. Fure o fundo para drenagem). Transplante mudas de tomateiro livres de nematóides para os vasos e mantenha-os em casa de vegetação (se possível). Em regiões quentes, dispo- nha-os mesmo ao ar livre, em lugar sombreado sobre tábuas que devem estar de 20 a 30cm acima do solo (vasos colocados no chão ou em lâminas de plástico estendidas no chão podem ser facilmente contaminadas por nematóides

do solo). Regue os vasos diariamente e ponha um pouco de adubo completo a cada 2 semanas. Mantenha as populações em mesas separadas na casa de vegetação ou em tábuas separadas se ao ar livre. Contaminações de uma para outra população podem confundir os dados se espécies de Meloidogyne estiverem envolvidas. Após um mínimo de 45 dias, seu inóculo estará pronto para uso.

3. Para um teste de hospedeiros, será necessário ter inóculo para 24 vasos. O melhor solo para os vasos é um solo areno-argiloso misturado com igual quantidade de areia de rio. Esta mistura deve estar livre de nematóides parasitas de plantas, particularmente espécies de Meloidogyne. Solo esterilizado com Brometo de Metila ou por autoclavagem podem ser usados se disponíveis. Um método prático de matar espécies de Meloidogyne do solo, é espalhá-lo, em uma camada de 2cm de espessura sobre um chão de concreto ou uma lâmina de plástico expô-lo ao sol até que seque.
4. Esvasie seis dos vasos inoculados, corte as raízes em pedaços pequenos e misture-as com o solo. Divida esta mistura em 24 partes e use cada parte para inocular cada um dos 24 vasos com solo esterilizado. Provavelmente o melhor procedimento é encher o vaso até 3/4 com solo esterilizado, adicionar o inóculo e terminar de encher com uma camada de solo esterilizado de aproximadamente 2cm de espessura. Encha quatro vasos com apenas solo esterilizado. Guarde os outros dois vasos para serem usados caso precise começar tudo de novo.
5. Transplante uma ou duas mudas dos seguintes espécies em cada quatro dos vasos inoculados: 1) fumo NC95, 2) Algodão Deltapine 16, 3) Pimentão California Wonder, 4) Melancia Charleston Grey, 5) Amendoim Florrunner e 6) Tomate Rutgers. Os vasos não inoculados são plantados com tomate Rutgers. (nota: sementes destas espécies podem ser obtidas através da Central do Projeto Internacional de Meloidogyne. P.O.Box 5397, Raleigh, North Carolina 27607, USA.)
6. Tomando todos os cuidados para prevenir contaminação como especificado no item 2 acima, regue, adube, e deixe as plantas crescerem por 50 dias se a média de temperatu

ra for de 24-30°C. Se a temperatura for mais alta cultive por 45 dias; se mais baixa por 55 dias.

7. Remova as plantas dos vasos, lave gentilmente o sistema radicular e examine sob microscópio estereoscópico ou lente de aumento. Procure por galhas e massas de ovos maduras (marrom claras). Dê nota para cada raiz como segue: Sem galhas ou massas de ovos = 0; uma ou duas galhas ou massas de ovos = 1; tres a dez = 2; onze a trinta = 3; de trinta e um a cem = 4; mais de cem = 5. Faça duas tabelas separadas uma para galhas outra para massas de ovos. Para cada planta calcule um índice médio de galhas e um separado para massas de ovos. Normalmente ambos os índices serão semelhantes; mas em alguns casos o índice de massa de ovos será menor. Se o índice de massas de ovos for menor, use este para tomar a decisão final. A suscetibilidade é medida pela reprodução e não pela formação de galhas.

C. Identificação:

A identificação é feita através da tabela 1. Se tudo correr bem as espécies ou raças de Meloidogyne e combinação de plantas com sinal mais (+) na tabela 1 terão uma média de notas de 4.0 ou mais, e aquelas com sinal menos (-) terão uma média de notas de 0, 1.0 ou 2.0.

Tomate é suscetível a todas as espécies e raças e é a planta indicadora. Se as plantas de tomate dos vasos com solo inoculado estão altamente infectadas, as outras notas positivas serão altas. Se são baixas, a probabilidade é que o inóculo foi inadequado e as outras notas serão anormalmente baixas. A graduação deve ser julgada parcialmente em relação a graduação do tomate. Infecção nas plantas de tomate dos vasos não inoculados indicam que a mistura do solo estava infestada, e esse experimento deverá ser repetido.

Se uma população com duas ou mais espécies de Meloidogyne é testada, haverão muitas graduações mais (+). Nesse caso o experimento deverá ser repetido usando massas de ovos das plantas hospedeiras diferenciais, isto é, plantas as quais tem sinais diferentes na tabela. Em uma mistura de M. incognita e M. javanica por exemplo, pimentão é o hospedeiro diferencial.

Para ganhar experiência na identificação por caracteres morfológicos as espécies identificadas pelo método do hospedeiro diferencial deveria ser verificada através de exame microscópico usando a técnica que será descrita no item III.

Tabela I. Tabela de Identificação do teste do hospedeiro diferencial.

Meloidogyne espécies e raças	Espécies/Cultivares Diferenciais*					
	Fumo NC95	Algodão Delta- pine 16	Pimentão California Wonder	Melância Charleston Grey	Amendoim Flor- runner	Tomate Rutgers
<u>M. incognita</u>						
Raça 1	-	-	+	+	-	+
Raça 2	+	-	+	+	-	+
Raça 3	-	+	+	+	-	+
Raça 4	+	+	+	+	-	+
<u>M. arenária</u>						
Raça 1	+	-	+	+	+	+
Raça 2	+	-	-	+	-	+
<u>M. javanica</u>	+	-	-	+	-	+
<u>M. hapla</u>	+	-	+	-	+	+

* Fumo (*Nicotiana Tabacum*) cv. NC95; Algodão (*Gossypium hirsutum*) cv. Deltapine 16; Pimentão (*capsicum frutescens*) cv. California Wonder; Melância (*Citrullus vulgaris*) cv. Charleston Grey; Amendoim (*Arachis hypogaeae*) cv. Florrunner; Tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rutgers.

D. Limitações do teste do hospedeiro diferencial

Os propósitos principais do teste do hospedeiro diferencial Carolina do Norte são para identificar as quatro espécies e as seis raças mostradas na tabela I, e detectar variações patogênicas dentro de populações de espécies.

Os resultados não podem ser interpretados como o estabelecimento de gama de hospedeiros dessas espécies ou raças. A resistência de cultivares à formação de galhas varia grandemente. O teste de todas as cultivares de qualquer cultura seria praticamente impossível. Mas até que isso seja feito, ninguém pode dizer que uma espécie de nematóide nunca se reproduz em dada espécie

cie de planta. Há também evidências de variações individuais em populações de Meloidogyne.

Conforme Sasser (1954) afirmou no início do desenvolvimento do teste do hospedeiro diferencial "O número relativamente pequeno de plantas testadas nesses estudos não revelam nenhum padrão geral o qual capacitaria a predição de resistência ou suscetibilidade entre espécies de plantas". Mais tarde com trabalhos realizados com maior número de populações de Meloidogyne e a adição de maior número de cultivares não mudou esta afirmativa básica. A única coisa que se pode afirmar a respeito do teste em sua forma atual, é que populações de M. incognita que se reproduzem em amendoim; populações de M. hapla que se reproduzem em Melancia; ou populações de M. arenaria, M. javanica e M. hapla que se reproduzem em Melancia; ou populações de M. arenaria, M. javanica e M. hapla que ataquem algodão não foram ainda encontradas.

Quando um hospedeiro aparentemente novo de uma espécie é encontrado, há a possibilidade que aquele cultivar é suscetível somente à aquela população particular testada e não suscetível a outras populações.

Variações nas espécies de plantas e nos indivíduos de uma população de Meloidogyne indicam que infecção e reprodução com qualquer combinação de espécies de Meloidogyne e espécies de plantas é possível.

II. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DO HOSPEDEIRO

O teste do hospedeiro diferencial Carolina do Norte pode ser padronizado pelo uso de ovos de Meloidogyne como inóculo. O procedimento é como se segue:

- 1) Lave raízes com galhas provenientes de plantas cultivadas em solo estéril inoculado e colhidas quando as massas de ovos apresentam coloração marrom clara. Normalmente entre 45-55 dias após a inoculação.
- 2) Corte as raízes em pedaços de aproximadamente 2cm de comprimento e coloque em um recipiente com capacidade de 500ml que contenha 200ml de uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% agite vigorosamente com amão por 3 minutos. Isso dissolve a matriz gelatinosa da massa de ovos (não exponha as raízes ao NaOCl por mais de 4 minu-

tos).

- 3) Verta a suspensão de ovos através de duas peneiras: a primeira de 100 mesh a 200 mesh (aberturas de 0.149 a 0.074mm) a segunda de 500 mesh (abertura de 0.028mm). Os ovos separados das massas de ovos passam através da primeira peneira e são retidos pela segunda. Os ovos da peneira de 500 mesh são lavados para retirar a solução de NaOCl com um suave jato de água fria da torneira e depois enxaguados para dentro de um recipiente previamente marcado para conter um litro. As raízes do recipiente original podem ser lavadas duas vezes ou mais para obter maior número de ovos.
 - 4) A concentração de ovos por mililitro no recipiente é de terminada enchendo-se o recipiente até a marca de um litro e contando-se o número de ovos em tres amostras de um mililitro cada.
 - 5) Use 10.000 ovos por vaso para inoculação. Experimentos com este método indicam que os ovos são esterilizados superficialmente e são mais uniformes como inóculo do que larvas de vários estágios. Massas de ovos são também boa fonte de inóculo, mas não podem nunca ser padronizadas.
- Para estimar reprodução, os ovos podem ser contados com o mesmo procedimento substituindo-se a solução de 1.0% de NaOCl a qual libera mais ovos do que uma solução de 0,5% (Hussey and Barker, 1973).

III. IDENTIFICAÇÃO AO MICROSCÓPIO

Devido à variações, espécimes individuais de espécies de Meloidogyne não pode ser positivamente identificados pelo estudo dos caracteres morfológicos. Populações de espécies de Meloidogyne podem ser identificados se for estudada uma amostra adequada. Uma amostra adequada é composta de nunca pelo menos de 10 fêmeas e suas massas de ovos de 10 pontos diferentes do campo. A identificação se torna mais fácil se forem utilizadas todas as informações disponíveis sobre a população.

A. Fêmeas



Fêmeas de espécies de Meloidogyne são preparadas para identificação pela fixação em aproximadamente 2% de Formaldeído por uma noite ou mais. (Nota: formalina comercial tem aproximadamente 37% de formaldeído por volume ou 40% por peso. Uma fórmula para aproximadamente 2% é uma parte de formalina comercial e 19 partes de água). Raízes contendo espécies de Meloidogyne podem ser fixadas e guardadas nesta solução. As fêmeas são obtidas por dissecação das raízes sob microscópio estereoscópico. Se montadas em lâminas de microscópio em formalina 2%, os espécimes podem ser utilizáveis por alguns dias. Se montadas em lactofenol e lutadas permanecerão indefinidamente.

A maneira de montar a fêmea para identificação é cortar-lhe o corpo tão próximo do final da parte posterior quanto possível, colocando o pedaço cortado virado para cima de maneira que a região perineal fique visível por cima. A lamínula é colocada sobre ambos os pedaços. Este sistema mantém o corpo e perineal juntas, e uma ou duas fêmeas podem ser montadas em cada lâmina. Os caracteres de identificação das fêmeas são: a relação do axis do pescoço com o axis do corpo, a posição do poro excretor e o padrão perineal.

A relação do axis do pescoço e do axis do corpo podem ser estudados sob microscópio estereoscópico. Espécimes vistas de lado mostrarão a disposição do pescoço se este for presente. O poro excretor é localizado seguindo-se o tubo excretor o qual é mais fácil de se ver do que o poro. Em espécimes em posição ventral, ambos, poro excretor e tubo podem ser difíceis de ver, sendo necessário olhar um novo espécime.

B. Larvas

A característica mais útil para identificação de larvas de M. incognita, M. javanica, M. arenária e M. hapla é a média de comprimento das larvas, obtidos pela mensuração de pelo menos 20 larvas, preferencialmente provenientes de quatro massas de ovos. Para medidas exatas, o comprimento das larvas é medido ao longo da linha central do corpo usando-se câmara clara. Muitas larvas fixadas ficam em posição curva com aproximadamente 1/6 de um círculo. O comprimento real de tais larvas é aproximadamente a distância em linha reta da cabeça até a extremidade da cauda mais 5%. A linha reta pode ser medida pelo uso de micrômetro ocular,

e é suficientemente acurada para separar larvas de M. arenaria (comprimento médio de 0.470mm) de larvas de M. incognita (0.376 mm) e M. javanica (0.370mm). Larvas de M. hapla (0.430mm) podem ser separadas das maiores larvas de M. arenaria e das menores de M. incognita e M. javanica. Para algumas espécies o comprimento da cauda da larva e a forma da cauda são características úteis para identificação.

C. Padrão Perineal

Após identificação da população de Meloidogyne pelo teste do hospedeiro diferencial, localização do poro excretor da fêmea e tamanho médio das larvas, se faz necessário o estudo do padrão perineal, para confirmação da identificação de espécies comuns de Meloidogyne.

Muitos pesquisadores montam de quatro a dez perineais por lâmina, usando o método descrito por Taylor e Netscher (1974).

- 1) Raízes infectadas são colocadas em solução de 0.9% de cloreto de sódio e as fêmeas são retiradas das raízes sob estereomicroscópio.
- 2) As fêmeas são transferidas para ácido lático 45% em uma placa de plástico ou para um pedaço de plástico dentro de uma placa de vidro e são cortadas com lâmina bem afiada (um pequeno bisturi usado em Oftalmologia ou uma agulha afiada).
- 3) Os resíduos dos intestinos são removidos cuidadosamente com uma agulha bem fina e flexível ou uma fibra.
- 4) A perineal é então transferida para glicerina em uma lâmina de microscópio. Uma lamínula é aplicada e a montagem é lutada com cêra ou qualquer outro selador.

Os padrões perineais são formados pela expansão e alteração do corpo da larva e retêm as linhas laterais, a extremidade da cauda e os fasmídeos.

D. Machos

Machos de Meloidogyne são de pouco valor para a identificação de espécies.

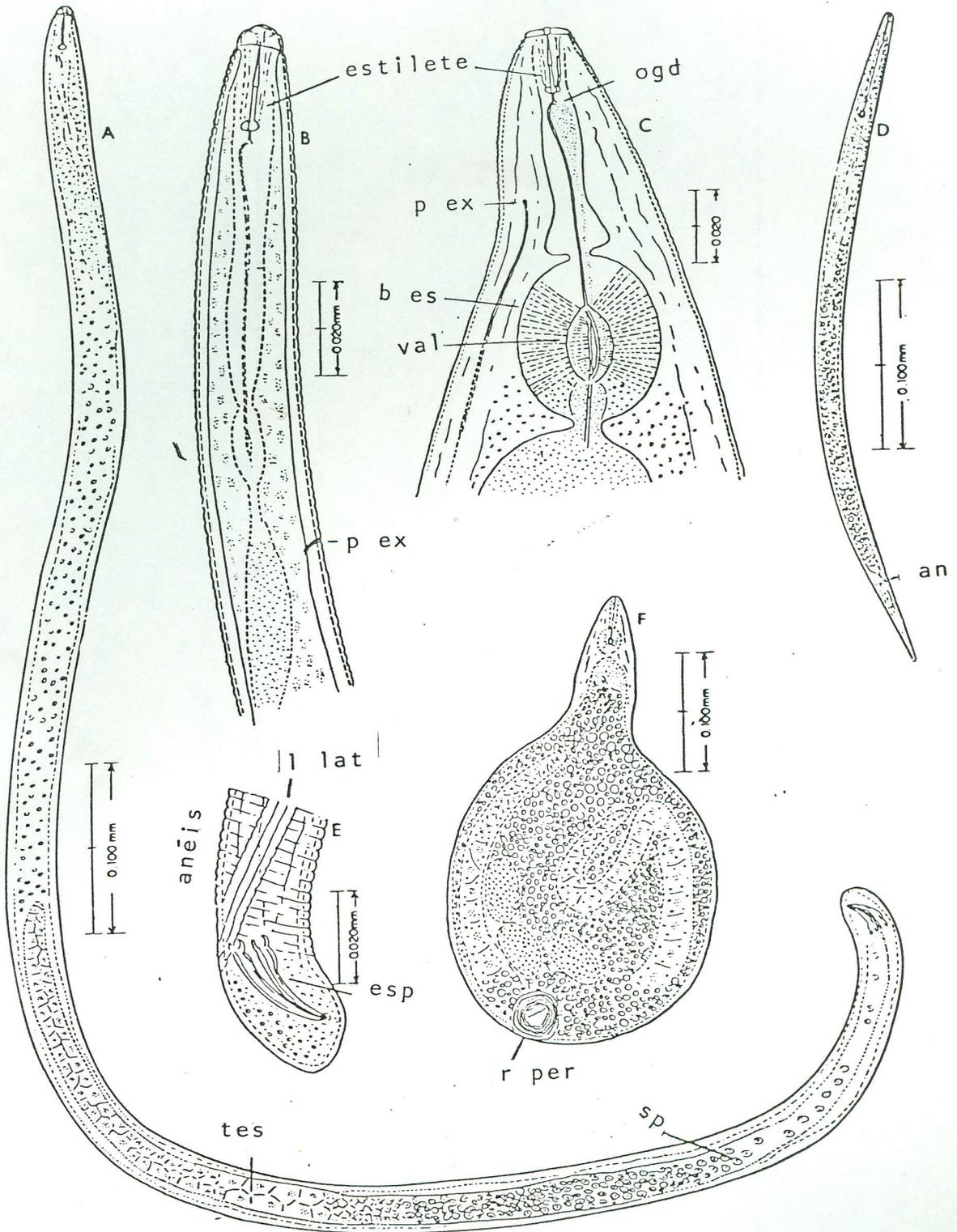
TESTES DE RESISTÊNCIA

I. Testes Preliminares

Testes visando resistência de cultivares fornecem melhores resultados se plantas germinadas em solo esterilizado forem transplantadas para solos inoculados com grande quantidade de ovos, larvas ou massas de ovos. A temperatura do solo deve ser mantida em uma média de 25°C e as plantas examinadas de certo em certo tempo para verificação da produção de galhas ou ovos. Quando se encontra produção de ovos de moderado a alta, a linhagem deve ser descartada. Plantas com poucas galhas e baixa produção de ovos são mantidas por 50 ou 60 dias antes que a leitura final seja feita. Linhagens com as mais baixas produções de ovos são mantidas e retestadas.

II. Testes de Campo

Nos estágios mais avançados do desenvolvimento ou criação de cultivares, as linhagens são testadas em larga escala, com repetições em diferentes partes do campo. Linhagens com baixa produção de ovos são retestadas em tantos campos diferentes quanto possível até que se tenha certeza de que a resistência é verdadeira. Seleções finais são feitas em experimentos de potencialidade de produção em campos infestados com Meloidogyne e em solos semelhantes porém tratados com nematicida (Kinloch e Hinson, 1972).



ANATOMIA DOS NEMATÓIDES DO GÊNERO MELOIDOGYNE:

A: Macho, corpo inteiro, mostrando estilete, testículos (test), esperma (sp), espículos. B: Macho parte anterior mostrando estilete, esôfago e poro excretor. C: Fêmea parte anterior mostrando estilete, orifício da glândula dorsal, poro excretor, bulbo esofágico e válvula. D: Larva mostrando estilete, bulbo esofágico e ânus (an). A cauda é a porção do corpo posterior ao ânus. E: Macho parte posterior, mostrando linhas laterais, anéis e espículos. F: Fêmea mostrando esôfago, ovários e região perineal. Taylor, 1967.

INSTRUÇÕES PARA COLETA, EMBALAGEM E ENVIO DE AMOSTRAS DE SOLO E RAÍZES DE SOJA PARA IDENTIFICAÇÃO DE NEMATÓIDES.

Quando observar em uma lavoura de soja, manchas ou reboleiras e que o aspecto destas apresentarem sintomas, na parte aérea de deficiências minerais, tamanho reduzido das plantas, amarelamento das folhas, murchamento no período mais quente do dia, queima internerval (folha carijó), deverá arrancar algumas plantas e verificar o sistema radicular. Caso apresente podridão nas raízes ou galhas deverá proceder da seguinte maneira:

- 1) Retirar raízes com uma pá ou enxadão tendo sempre o cuidado de coletar o solo que circunvizinha as raízes numa profundidade de até 25cm correspondendo, mais ou menos 300g de solo;
- 2) Colocar tanto o solo, como as raízes, em um saco plástico, fechando-o a seguir. Anexar uma etiqueta com numeração para controle;
- 3) Remeter imediatamente a amostra para análise juntamente com a ficha de informações sobre a lavoura.

OBSERVAÇÃO:

- 1) Normalmente a melhor época para coleta de amostras é no estágio de formação de vagens, devido a maior atividade dos nematóides neste período.
- 2) Não se deve coletar amostras de solo e raízes quando a lavoura estiver muito seca ou encharcada porque a população de nematóides estará reduzida.
- 3) As amostras devem ser tratadas com muito cuidado porque os nematóides são seres vivos carentes de umidade. Portanto, o solo e as raízes devem ser conservados livres do calor excessivo do sol, e a secagem dos mesmos deve ser evitada. Caso não puder enviar logo as amostras, guardá-las no refrigerador.
- 4) Nem todos nematóides que parasitam a cultura de soja apresentam sintomas de ataque na parte aérea e nem formam galhas no sistema radicular.
- 5) Sempre que possível enviar solo, raízes e parte aérea de ervas daninhas da lavoura com os seus respectivos nomes comuns.

INFORMAÇÕES GERAIS

1. Nº. da amostra _____ 2. Data da coleta _____
3. Nome do interessado _____
4. Local _____ Município _____
5. Endereço p/resposta _____
6. Coletor _____
7. Cultura _____ Cultivar _____
8. Data do Plantio _____
9. Culturas anteriores ou rotação usada _____
10. Área cultivada _____
11. Finalidade da Exploração:
 Industrial Ensaio Produção de Sementes
12. Vegetação circunvizinha:
 Mata Reflorestamento Capoeira Pastagem
 Campos. Se lavouras, quais? _____
13. Topografia da lavoura:
 Plana Acidentada Ondulada
14. Locais da Coleta:
 Bordo Baixada Topo Encosta Centro
15. Fase de desenvolvimento das plantas _____
16. Material coletado:
 Solo Raiz
17. Sintomas observados:
 Murcha Clorose Nanismo Podridão
 Galhas Queda prematura de folhas Outros
18. Distribuição do ataque:
 Planta isoladas Reboleira Generalizada
19. Área (m²) do ataque _____
20. Quando foram observados os primeiros sintomas _____

21. Ervas daninhas predominantes na lavoura _____

22. Textura do solo :
 Arenosa Argilosa Mista
23. Adubação usada (especificar fórmula, quantidade, época e modo):

24. Calagem usada (quantidade, época e modo): _____

25. Defensivos usados (contra praga e/ou doenças): _____

26. Observações _____

PREENCHIMENTO PELO LABORATÓRIO

01. Nº. do laboratório _____

02. Data do recebimento _____

03. Condições do material recebido _____

04. Observações no laboratório _____

05. Data da análise _____

06. Resultado _____

Solo _____ Raízes _____

07. Recomendações _____

08. Técnico responsável _____

09. Observações _____

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE NEMATÓIDES DO SOLO E DOS TECIDOS DAS PLAN
TAS

As populações de nematóides podem consistir de formas móveis, ligeiramente móveis ou inativas, cistos, ovos individuais, ovos em massas ou várias combinações destes. Formas ectoparasitas acham-se no solo propriamente dito, enquanto altas percentagens de endoparasitos acham-se nas raízes ou em fragmentos de raízes durante certos períodos do ano. Larvas ativamente móveis ou adultas podem ser extraídas por: 1) funil de Baermann ou quaisquer de suas modificações, como o uso de tabuleiros em vez de funis ; 2) uma combinação de peneira e métodos de Baermann; 3) flutuação e lã de algodão (Dostenbrink, 1960). Os métodos adaptados tanto às formas móveis como imóveis incluem: 1) peneiramento; 2) elutriação; 3) flutuação centrífuga; 4) peneiramento e flutuação no açu-

car; 5) aparelho de sedimentação de dois frascos Erlenmeyer de Seinhorst. Estes últimos são de uso limitado para endoparasitos quando a maioria está dentro das raízes.

I. MÉTODOS DE SEPARAR NEMATÓIDES DO SOLO

A) Método de Flutuação e Peneiramento (Byrd et al. 1966), modificado.

- 1) Misture e peneire o solo.
- 2) Coloque 50cc de sub-amostra num Becker de 100ml
- 3) Usando uma vasilha com capacidade para 1000ml, coloque 500 ml de solução açucarada com Separan.
- 4) Coloque os 50cc de solo nesta solução e agite por 45 segundos.
- 5) Deixe o solo assentar por dois minutos.
- 6) Decante o líquido numa peneira de malha 32 sobre outra peneira de malha 325.

OBS.: O líquido deve ser decantado na borda interna da peneira, evitando que caia diretamente sobre a malha da peneira. Para isso devemos trabalhar com as peneiras um pouco inclinadas.

- 7) Enxague a peneira de malha 32 enquanto ainda acima da peneira de malha 325.
- 8) Usando uma vasilha de lavar (pisseta), enxague a suspensão de nematóides e fragmentos da peneira de malha 325 para um becker de 100ml, até atingir mais ou menos 50ml de H₂O.
- 9) Faça girar o conteúdo do becker e deixe assentar de 5-10 seg.
- 10) Decante a suspensão de nematóides em uma peneira de malha 400 e enxague de novo em um Becker de 100ml, ficando mais ou menos 20ml de H₂O.
- 11) Contagem - Faça girar o conteúdo do Becker (passo 10) e derrame em um prato plástico de contagem. Use o suporte mecânico do microscópio estereoscópico ou faça-o manual para contagem.

B) Flutuação - Centrífuga (Jenkins, 1964)

- 1) Misture e peneire o solo.
- 2) Coloque 100cc de sub-amostra num becker de 600ml e adicione água suficiente para um volume de 500ml.

- 3) Mexa por 20 segundos e deixe o solo assentar por 60 segundos.
- 4) Decante uma peneira de malha 40 sobre uma peneira de malha 325.
- 5) Usando uma garrafa de lavar (pisseta), enxague a peneira de malha 40 enquanto ainda sobre a peneira de malha 325.
- 6) Lave os fragmentos e nematóides da peneira de malha 325 para um becker de 150ml.
- 7) Derrame a lavagem (passo 6) em tubos centrífugos de 50ml.
- 8) Coloque os tubos na centrífuga (equilibre a centrífuga com precisão)
- 9) Centrifugue a 420 (1400 r.p.m.) por 5 minutos.
- 10) Decante água dos tubos.
- 11) Preencha os tubos centrífugos com solução de sacarose (500g por litro de solução) e misture.
- 12) Centrifugue por 60 segundos a 420G (1400r.p.m.), não use trava.
- 13) Decante solução de açúcar - suspensão de nematóide em uma peneira de malha 400.
- 14) Enxague resíduo e nematóides da peneira de malha 400 para um becker de 150ml (\pm 20ml H₂O).
- 15) Conte como indicado em (11) na Flutuação- Peneiramento.

C) Funil de Baermann e Modificações (ver Southey, 1970)

Esta técnica básica consiste em um funil cônico de vidro com um tubo curto de borracha ou plástico ligado ao pé do funil cônico. O tubo é fechado por um grampo de mola. Um suporte de malha de aço inox ou plástico descansa dentro do topo do funil. Lenços de papel resistentes à umidade ou outro material adequado é colocado sobre este suporte para reter o solo. Água de torneira ou água contendo 2 ppm de azul de metileno e 2 ppm Separan é o melhor para encher o funil. O funil de Baermann pode ser usado para extrair nematóides de: 1) solo; 2) resíduos de peneiras; 3) partes de plantas. Uma versão melhorada desta técnica envolve o uso de tabuleiros de extração (Southey, 1970) em vez de funis. Somente nematóides ativamente móveis podem ser isolados por estes processos. É especialmente útil para a espécie Pratylenchus durante o verão e outras épocas quando tais nematóides (endoparasitos migratórios) acham-se em tecidos de plantas.

D) Separação de Cistos do Solo

Cistos de Heterodera spp. usualmente requerem processos especiais de extração. Estes passarão por uma peneira de malha 25, mas ficarão retidos numa peneira de malha 60. Cistos não secos suspensos em sacarose (454g/litro de solução com 12,5ppm Separan) podem ser coletados, derramando-se a suspensão por essa peneiras. Cistos secos flutuarão e podem ser coletados de uma maneira semelhante. A lata de Fenwick (Goodey, J.B. 1963) podem também ser usada para lavar cistos do solo.

II. MÉTODOS DE SEPARAR NEMATÓIDES DOS TECIDOS DE PLANTAS

a) Técnicas de Extração a vaporizador de névoa de Seinhorst.

O material da planta é colocado numa tela ou funil de Baermann (pode ser uma tela grossa ou fina) e vaporizada com uma fina névoa de água de esguichos acima. O esguicho são ajustados a uma saída de uma torneira comum de água. A água que pinga através da tela é recolhida em painéis rasos, pratos ou tabuleiros abaixo. Os nematóides saem do tecido da planta e são levados pela água para as painéis coletoras onde assentam no fundo. Nematóides suspensos em água não turbulenta assentam bastante rapidamente. A água da superfície é decantada da panela e os nematóides e a água do fundo são coletados num becker. A suspensão de nematóides pode ser mais concentrada, deixando-se os nematóides assentados no fundo do becker, e depois decantando-se a água da superfície. Este método é útil para se obter grandes quantidades de Ditylenchus de hastes secas de alfafa infestada e de Pratylenchus de raízes de vários hospedeiros. Para grande número de amostras de raízes ou tecidos, uma grade de funis de Baermann deve ser arranjada sob uma intermitente névoa regulada com uma válvula solenóide e relógio de tempo.

b) Exame Direto

O tecido é colocado em água rasa num prato de vidro ou vidro de relógio e é erigado com agulhas dissecadoras enquanto é observado através de um microscópio estereoscópico 10-20X. Nematóides

des saprofíticos geralmente acompanham formas parasitas nos tecidos de planta e podem ser distinguido só por exame microscópico.

c) Funil de Baermann:

As partes da planta são cortadas em pedaços pequenos e colocados no papel facial no funil e ligeiramente cobertas com água. As amostras devem ser retiradas e a água adicionada frequentemente (cada 12-24 horas) devido à pouca aeração que predomina com raízes apodrecendo. (Uso de 1:100 Streptomina aumenta a eficiência).

d) Liquidificador e Peneiramento:

Raízes lavadas, cortadas em pedaços de mais ou menos 1,5cm são trituradas com água num liquidificador por 10-20 segundos em alta velocidade. Use cerca de 80ml de água para 10g de tecido. O material liquidificado é derramado por uma peneira de malha 25 ou 35 sobre uma peneira de malha 270 ou 325 resíduo da peneira fina pode ser examinado num vidro de relógio ou colocada num funil de Baermann.

III. ISOLAMENTO DE OVOS DE NEMATÓIDES DO SOLO E TECIDOS DE PLANTAS

Extração quantitativa e identificação de ovos de nematóides tem muitos problemas. Entretanto, progressos considerável tem sido feito recentemente. Processos úteis recentemente desenvolvidos são:

a) Centrifugação (Flegg x McNamara, 1968; Dunn, 1973).

b) Misturador Centrífuga (Gooris e D'Herde, 1972)

c) Elutriação

Dissolução de matrizes gelatinosas de massas de ovos - coloração (Byrd et al., 1972) - Este método foi desenvolvido para determinar número de ovos de Meloidogyne spp.

O uso de 1.0% NaOCl (Clorox) por 4 minutos e peneiramento (

peneira de malha 500) também fornece um processo rápido para preparar ovos limpos de Meloidogyne spp para uso como inóculo (Hussey e Barker, 1973).

IV . COLORAÇÃO DE NEMATÓIDES "In situ" EM TECIDOS DE PLANTAS

Muitos métodos são descritos por vários autores (Southey , 1970). Um dos métodos mais usados envolve uma solução diluída (0.05%) de azul de algodão ou de fuccina ácida em lactofenol (fenol líquido: ácido láctico: glicerina: água - 3:1 - 2:1) Calor é aplicado ou fervendo por 2 a 10 minutos, ou aquecendo a 55° - 60° C por cerca de duas horas; o último é melhor. As partes da planta são, então, descoloridas em lactofenol e montadas numa lâmina de microscópio (MacBeth et al. 1941) Alves e Bergeson, (1967) recentemente relataram que autoclave por 15 minutos daria imediata descoloração de tais raízes. Raízes coloridas também podem ser colocadas numa solução aquosa saturada de cloral hidratado por 30 minutos a duas horas para descoloração.

V. MÉTODO DE FIXAR NEMATÓIDES EM LÂMINAS PERMANENTES

- 1) Retirar o vidro de Siracusa da câmara escura.
- 2) Fazer identificação dos nematóides.
- 3) Colocar os nematóides em um becker de 50ml, com mais ou menos 30ml de H₂O. Coloca-se em banho-maria ou fogo direto até atingir a temperatura de 55-60°C.
- 4) Deixa-se esfriar, coloca-se o fixador TAF até atingir 50ml, deixando de 12-24 horas.
- 5) Retira-se o TAF com um sifão, deixando apenas mais ou menos 2ml.
- 6) Adiciona-se glicerina 2,5% até atingir novamente mais ou menos 20-30ml, deixando por mais 24 horas.
- 7) Retira-se a glicerina 2,5% (com um sifão) até atingir novamente 2ml.
- 8) Coloca-se glicerina 5%, até 5-10ml, transferindo para um vidro de Siracusa, deixando até desidratar (\pm 20 dias) ou levar em estufa a uma temperatura de 30-40°C (\pm 3-4 dias).
- 9) Retire os nematóides, transferindo-os para uma lâmina mi-

croscópica com 5-10 nematóides com uma disposição uniforme, coloque calços de fibra de vidro ou outro material plástico com espessura mais ou menos igual a do nematóide, para que a lamínula não apoie diretamente sobre o nematóide (a lâmina deve ser montada em glicerina pura). Finalmente lute-a com Zut ou esmalte.

S O L U Ç Õ E S

I. Açucarada c/Separan

2,5ml de Separan + 242g de açúcar p/litro H₂O

II. Lactofenol

H ₂ O destilada	10cc
Ácido Fênico	10cc
Glicerina Pura	20cc
Ácido Lático	10cc

III. TAF - Forte Modificado

H ₂ O distilada	750cc
Formol 35-40%	140cc
Trietanolamina	040cc
Álcool absoluto	070cc

B I B L I O G R A F I A

- BYRD, D.W.Jr., C.J. NUSBAUM and K.R.BARKER. 1966. A rapid flotation-sieving technique for extracting nematodes from soil. Plant Dis.Reptr- 50: 954-957.
- FLEGG, J.J.M. and D.G. MACNAMARA. 1968. A direct sugar-centrifugation method for the recovery of eggs of Xiphinema, Longidorus and Trichodorus from soil. Nematologica 14: 156-157.
- GOODEY, T. 1963. Soil and freshwater nematodes. (Rewritten by J.B.Goodey). John Wiley and Sons, Inc., New York. 544pp.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Dis. Repr. 48: 692.
- LORDELLO, L.G. E. 1973. Nematóides das plantas cultivadas. 2a. Edição. Livraria Nobel S.A. São Paulo. 197 pp.
- SEINHORST, J.W. 1956. The quantitative extraction of nematodes from soil. Nematologica 1: 249-267.
- SOUTHEY, J.F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Tech. Bull. Minist. Agric. Fish. Food No. 2, 148 pp.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, Identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne Species). North Carolina State University/USAID. 111 pp.