HISTOLOGIA DE GALHAS DA COROA DE CHUCHU (*Sechium edule*) INDUZIDAS POR *Agrobacterium tumefaciens* E INFESTADAS POR *Meloidogyne incognita* E DESENVOLVIMENTO DE DOIS SISTEMAS DE CULTIVO *in vitro* PARA *Meloidogyne javanica*.

BENEDITO VASCONCELOS MENDES

Orientador: PAULO DE CAMPOS TORRES DE CARVALHO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 1980

À memória daqueles que me deram a vi
da e me ensinaram a amar e a viver,
MILTON e MARIA JOSÉ; à minha esposa
MARIA JOSÉ e aos meus filhos TELY,
MILTON NETO, LIANA e CAMILA que mini
mizam as agruras e aumentam as ale-
grias do meu caminhar.

DEDICO.

A G R A D E C I M E N T O S

No ensejo da apresentação deste trabalho, é grande o prazer de externar os nossos sinceros agradecimentos, a todos aqueles que contribuíram para a realização desta tese e para o nosso aprendizado durante o curso de Doutorado em Fitopatologia.

Ao Professor PAULO DE CAMPOS TORRES DE CARVALHO, pela orientação e revisão dos originais.

Ao Professor OTTO JESU CRÓCOMO, pela permissão para que parte desta pesquisa, fosse realizada no Laboratório de Bioquímica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), sob a sua supervisão.

Ao Professor FERDINANDO GALLI, em reconhecimento ao eficiente trabalho de coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Aos Professores LUIZ GONZAGA E. LORDELLO, WALTER RADAMÉS ACCORSI, SALVADOR DE TOLEDO PIZA JÚNIOR, TASSO LEO KRUGNER e HIROSHI KIMATI, pela revisão dos originais e sugestões apresentadas.

Aos Professores CLOVIS FERRAZ DE OLIVEIRA SANTOS, FRANCISCO VALTER VIEIRA, LUIZ ANTONIO ROCHELLE, ERIC BALMER, HASIME TOKESHI, CAIO O.N. CARDOSO, ELKE J.B.N. CARDOSO, CLÉLIO L. SALGADO e ARMANDO BERGAMIN FILHO, pelos ensinamentos e amizade que nos dispensaram.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela convivência familiar que nos proporcionaram.

Expressamos também a nossa gratidão à Escola Superior de Agricultura de Mossoró, pela permissão para a realização deste curso; à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal Docente de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida e à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade oferecida, para que participássemos deste Curso de Pós-Graduação.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1. Galhas induzidas por <i>Meloidogyne</i> spp. e por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
3.1.1. Galhas causadas por <i>Meloidogyne</i> spp.	8
3.1.2. Galhas da coroa induzidas por <i>A.</i> <i>tumefaciens</i>	10
3.1.3. Interação <i>Meloidogyne</i> spp. x <i>A.</i> <i>tumefaciens</i>	11
3.2. Cultivos <i>in vitro</i> de fitonematóides	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Histologia de galhas da coroa infesta- das por <i>M. incognita</i>	36
4.1.1. Obtenção, multiplicação e prepa- ração do inóculo de <i>M. incog-</i> <i>nita</i>	36
4.1.2. Preparação do inóculo e método de inoculação de <i>A. tumefaciens</i>	38
4.1.3. Sequência das inoculações de <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> e de <i>M. incognita</i> nas plantas de chuchu	39

4.1.4. Preparação de segmentos de galhas da coroa infestados pelo nematóide para as observações microscópicas	39
4.2. Desenvolvimento de dois sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de <i>M. javanica</i>	40
4.2.1. Produção de sistemas radiculares a partir de culturas de eixo embrio <u>n</u> ário de feijoeiro	40
4.2.2. Produção de plantas inteiras a partir de culturas de eixo embrio <u>n</u> ário de feijoeiro	42
4.2.3. Obtenção e multiplicação do nematóide (<i>M. javanica</i>)	42
4.2.4. Preparação do inóculo de <i>M. javanica</i> e inoculação das plantas inteiras e dos sistemas radiculares origi <u>n</u> ários de culturas de eixos embrio <u>n</u> ários de feijoeiro	43
4.2.5. Preparação de galhas das plantas in <u>t</u> eiras e dos sistemas radiculares produzidos <i>in vitro</i> para as obser <u>v</u> ações histológicas	44
4.2.6. Preparação de raízes com galhas, de feijoeiros desenvolvidos em solo, para as observações histológicas	45

5. RESULTADOS	46
5.1. Histologia de galhas da coroa infestadas	
por <i>M. incognita</i>	46
5.2. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>M. javanica</i>	48
6. DISCUSSÃO	60
6.1. Histologia de galhas da coroa infestadas	
por <i>M. incognita</i>	60
6.2. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>M. javanica</i>	65
7. CONCLUSÕES	69
8. SUMMARY	71
9. LITERATURA CITADA	74

LISTA DE TABELASTABELAPágina

1	Cultivos axênicos de fitonematóides	18
2	Culturas monoxênicas de fitonematóides sobre fungos	19
3	Culturas monoxênicas de nematóides sobre raí- zes decepadas	22
4	Culturas monoxênicas de nematóides sobre ca- los vegetais	25
5	Cultivos de fitonematóides em plantas intei- ras sob condições gnotobióticas	33

LISTA DE FIGURASFIGURAPágina

- 1 Corte de galha da coroa de planta de chuchu, induzida por *A. tumefaciens* e infestada por *M. incognita*. Conjunto de células gigantes circundado por uma região condutora, constituída de elementos condutores anômalos, orientados radialmente às células gigantes. Observa-se a predominância de elementos do floema, exibindo áreas crivosas. (92,6 X) 50
- 2 Corte de galha da coroa de planta de chuchu, induzida por *A. tumefaciens* e infestada por *M. incognita*. Conjuntos de células gigantes próximos uns aos outros, envolvidos e separados por uma única região condutora. (92,6 X) 51
- 3 Fêmea adulta de *M. incognita* associada a um conjunto de células gigantes, no interior de galha da coroa de planta de chuchu induzida por *A. tumefaciens*. (92,6 X) 52

FIGURAPágina

- 4 Planta inteira de feijoeiro desenvolvida em meio E_2 , a partir de cultura de eixo embri $\bar{o}$ nário, aos 47 dias de idade e após 32 dias da inoculação de *M. javanica*. Observam-se galhas em raízes aéreas. (92,6 X) 53
- 5 Corte longitudinal de uma galha, induzida por *M. javanica* em raiz de planta inteira de feijoeiro, produzida *in vitro*, a partir de eixo embrionário semeado em meio E_2 . Verifica-se que a fêmea está na região cortical da galha, associada a um conjunto de células gigantes, localizado no cilindro central. (92,6 X) 54
- 6 Fêmea de *M. javanica* associada a um conjunto de células gigantes, no interior de galha de sistema radicular produzido em meio E, a partir de eixo embrionário de feijoeiro. O aspecto das células gigantes é semelhante ao exibido por este tipo de célula, induzida em raiz de feijoeiro desenvolvido em solo. (92,6 X) 55

FIGURAPágina

- 7 Corte longitudinal de raiz de planta inteira de feijoeiro, produzida a partir de eixo embrionário semeado em meio E_2 , mostrando fêmea jovem de *M. javanica* em forma de salsicha, associada a um conjunto de células gigantes. O nematóide está localizado totalmente no interior do cilindro central da raiz. (92,6 X) 56
- 8 Células gigantes formadas no interior de galha de raiz de feijoeiro, desenvolvido em solo. (92,6 X) 57
- 9 Corte transversal de raiz de planta inteira produzida *in vitro*, através da semeadura de eixo embrionário em meio E_2 . Nota-se que as células gigantes localizam-se na região central da raiz. As células gigantes são semelhantes àsquelas induzidas em raiz de feijoeiro desenvolvido em solo. (92,6 X) 58
- 10 Corte longitudinal de uma galha induzida em sistema radicular produzido *in vitro*, através da semeadura de eixo embrionário de feijoeiro em meio E. Resto do corpo de uma fêmea adulta, localizada no cilindro central, associada a uma ooteca. (92,6 X) 59

1. RESUMO

Mudas de chuchu (*Sechium edule* Sw.) foram inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens* (Smith e Townsend) Conn. e quando as plantas apresentavam galhas da coroa, bem desenvolvidas, foi feita uma outra inoculação com *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949. Após três meses da inoculação do nematóide, segmentos de galhas da coroa foram coletados e preparados para observações histológicas, visando-se estudar aspectos biológicos do complexo planta-bactéria-nematóide.

Nas observações microscópicas de cortes de galhas da coroa, constatou-se grande quantidade de conjuntos de três a cinco células gigantes, associados a fêmeas do nematóide.

de. Os conjuntos de células gigantes encontravam-se, geralmente, circundados por uma espessa região diferenciada, constituída por camadas de elementos condutores curtos e anômalos, quase sempre orientados no sentido radial às células gigantes. As células gigantes tinham aspecto semelhante àquele exibido por este tipo de células, quando induzidas em raízes.

Devido à inexistência, em galhas da coroa, de um sistema vascular estruturado, foi interpretado que o nematóide, além de induzir a formação de células gigantes, provoca também o aparecimento da região condutora que envolve os conjuntos dessas células. A região condutora, provavelmente serve para carrear nutrientes do tecido da galha da coroa para as células gigantes. Sugere-se também que, tanto as células gigantes como a região condutora, são induzidas pelo nematóide, a partir de células da galha da coroa já modificadas pela ação da bactéria (células tumorais).

M. incognita desenvolveu-se bem, produzindo grande número de ootecas no interior de galhas da coroa induzidas por *A. tumefaciens* em plantas de chuchu.

Foram também desenvolvidos dois sistemas de cultivo *in vitro* para *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Produziram-se plantas inteiras e sistemas radiculares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. 'Carioca') em frascos erlenmeyers de 125ml, através da técnica de cultura de tecido, utilizando-se eixos embrionários como propágulos. Quan

do as plantas inteiras e os sistemas radiculares atingiram 15 dias de idade, foram inoculados com ovos axenizados de *M. javanica* e depois de 32 dias da inoculação, as galhas foram coletadas e preparadas para observações microscópicas.

Para a obtenção das culturas *in vitro* de plantas inteiras e de apenas sistemas radiculares de feijoeiro, utilizaram-se culturas de embrião nos meios E_2 e E, respectivamente. O meio E_2 quando semeado com embrião de feijoeiro propicia a diferenciação total e perfeita da planta e o meio E proporciona a produção de calos e posterior morfogênese de raiz a partir de eixo embrionário dessa leguminosa.

Não se observaram diferenças no desenvolvimento de *M. javanica* em raízes de plantas inteiras ou em apenas sistemas radiculares produzidos *in vitro*, mas o uso de sistemas radiculares oferece mais vantagens. Em ambos os substratos, as larvas do nematóide penetraram e induziram a formação de galhas e células gigantes. As galhas tornaram-se visíveis entre o quarto e o décimo dia após a inoculação.

Cortes histológicos de galhas coletadas de raízes de plantas inteiras e das culturas de sistemas radiculares, preparados 32 dias após a inoculação dos ovos de *M. javanica*, revelaram a presença de fêmeas adultas bem desenvolvidas, células gigantes e massas de ovos. As células gigantes eram semelhantes àsquelas induzidas por esse nematóide em raízes de feijoeiro desenvolvendo-se em solo.

As culturas de sistemas radiculares infestadas pelo nematóide, desenvolveram-se por mais de 80 dias e as de plantas inteiras apresentaram crescimento muito vagaroso.

As vantagens desses dois sistemas de cultivo de *M. javanica* quando comparados com o cultivo sobre raízes decepadas, são a formação de grande número de raízes e o pequeno risco de contaminação que oferecem.

2. INTRODUÇÃO

Muitos nematóides, além de serem importantes patógenos aos vegetais, causando sérias doenças em muitas culturas de importância econômica, podem também associar-se a outros fitopatógenos ou mesmo, a microrganismos saprófitas do solo, para originar complexos etiológicos que geralmente provocam doenças severas. As doenças complexas, resultantes do efeito sinérgico de fitonematóides com outros patógenos do solo, quase sempre são mais severas do que a soma dos efeitos das duas doenças provocadas por esses organismos isoladamente. Há uma interação com um conseqüente aumento de patogenicidade dos organismos envolvidos.

A ocorrência conjunta de nematóides do gênero

Meloidogyne e *Agrobacterium tumefaciens* em uma mesma planta já foi constatada por vários pesquisadores, porém, até o presente, quase nada se conhece sobre o efeito sinérgico do complexo formado por esses dois fitopatógenos.

Cultivos de nematóides sobre plantas, órgãos ou tecidos vegetais, em condições gnotobióticas, têm sido utilizados em trabalhos diversos na pesquisa nematológica, principalmente em investigações que exigem alto controle das variáveis biológicas. Muitos estudos bioquímicos, fisiológicos e de interação nematóide-planta são dificultados ou mesmo não podem ser realizados na ausência de cultivos gnotobióticos. Inegavelmente, a utilização de cultivos gnotobióticos de fitonematóides, vem proporcionando notáveis avanços à ciência nematológica. Conquanto a multiplicação e manutenção *in vitro* de várias espécies de fitonematóides, sobre culturas de calos vegetais ou de fungos já sejam rotineiras em muitos laboratórios de nematologia, até o momento, o cultivo *in vitro* de nematóides das galhas não é feito com tanta eficiência como aquele de nematóides que se desenvolvem bem, nesses dois substratos citados.

Ante a inexistência, na literatura disponível, de trabalhos que se reportem ao comportamento de nematóides do gênero *Meloidogyne* no interior de galhas da coroa e, diante da necessidade de se desenvolver um método de cultivo *in vitro* para *Meloidogyne* spp., que seja mais prático e eficiente do que os já existentes, programou-se a presente pesquisa. Dois es-

tudos foram planejados, um visando estudar as alterações histológicas de galhas da coroa de chuchu, induzidas por *Agrobacterium tumefaciens* e infestadas por *Meloidogyne incognita*, envolvendo vários aspectos biológicos do complexo planta-bactéria-nematóide e o outro, objetivando desenvolver um método de cultivo gnotobiótico para os nematóides das galhas. Para o último estudo, foram idealizados dois sistemas de cultivos *in vitro* para *Meloidogyne javanica*, um dos quais sobre sistema radicular e o outro sobre planta inteira, sendo ambos os substratos produzidos a partir de culturas de embrião de feijoeiro.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Galhas induzidas por *Meloidogyne* spp. e por *Agrobacterium tumefaciens*

3.1.1. Galhas causadas por *Meloidogyne* spp.

Uma das primeiras respostas da planta hospedeira aos nematóides do gênero *Meloidogyne* é a formação de galhas em suas raízes (ENDO, 1971). Além das raízes, já foi constatada a indução de galhas e/ou células gigantes por estes nematóides em tubérculos, rizomas, caules, folhas e em nódulos de leguminosas causados por bactérias do gênero *Rhizobium* (COLBRAN, 1961; FASSULIOTIS e DEAKIN, 1973; HUANG, 1966; JENKINS e

BIRD, 1962; KRUSBERG e NIELSEN, 1958; MENDES et alii, 1978b; MILLER e DiEDWARD, 1962; TAHA e RASKI, 1969; TAYLOR, 1976; WONG e WILLETTS, 1969). Essas galhas são de crescimento auto limitado e o seu desenvolvimento depende do estímulo continua do do patógeno (BRAUN, 1959). Estruturalmente, as galhas induzidas pelos citados nematóides, são constituídas por um ou mais conjuntos de células gigantes, que servem para nutrir o nematóide e por um espesso tecido parenquimatoso envolvente, resultante da hipertrofia e hiperplasia das células corticais da raiz. Este tecido é que delimita o tamanho e a forma da galha. No interior da galha encontram-se as fêmeas e ootecas do nematóide (MENDES et alii, 1977).

As larvas do segundo estágio de *Meloidogyne* spp. penetram no meristema terminal da raiz. Inicialmente, atravessam o dermatogênio, migram inter e intracelularmente através do periblema e ao atingirem o pleroma injetam secreções esofageanas (BIRCHFIELD, 1965; CHRISTIE, 1936; DROPKIN e NELSON, 1960; HUANG e MAGGENTI, 1969; KRUSBERG e NIELSEN, 1958; MENDES et alii, 1977; SIDDIQUI, 1971b). Essas secreções vão pro vocar a formação de três a seis células gigantes, medindo cada uma, cerca de 150 a 350µm podendo atingir em alguns hospedeiros, até 600µm de comprimento (JONES e DROPKIN, 1976). O nematóide alimenta-se dessas células por um período às vezes superior a 30 dias, tempo em que se dá o aumento do tamanho do nematóide de aproximadamente 1.000 vezes, além da produção de centenas de ovos (BIRD, 1978; JONES et alii, 1975).

Em 1972, JONES e NORTHCOTE sugeriram que as células gigantes sejam exemplos de células de transferência multinucleadas, especializadas em carrear nutrientes do sistema vascular da raiz para o nematóide. Existem vários trabalhos (BIRD e LOVEYS, 1975; JONES e DROPKIN, 1975; JONES e DROPKIN, 1976; JONES e NORTHCOTE, 1972; McCCLURE, 1977), mostrando a similaridade das células gigantes induzidas por nematóides das galhas, com as chamadas células de transferência, descritas por PATE e GUNNING (1972). Células de transferência são encontradas normalmente em outras partes da planta como, regiões de crescimento ativo e tecidos secretores, e são especializadas, no transporte seletivo e intensivo a curta distância.

3.1.2. Galhas da coroa induzidas por *A. tumefaciens*

As galhas da coroa, causadas por *A. tumefaciens*, são completamente diferentes das galhas induzidas por nematóides do gênero *Meloidogyne*. As galhas da coroa apresentam forma indeterminada, crescimento não auto-limitado e dependendo de certas condições, podem atingir grandes tamanhos. O crescimento dessas galhas independe da presença continuada do agente causal. A bactéria apenas induz a multiplicação inicial das células hospedeiras e este processo, uma vez desencadeado, dispensa a presença do patógeno (BARNES, 1968; BRAUN, 1943; BRAUN, 1957; BRAUN, 1959; BRAUN, 1962; KADO, 1976). As bac

térias introduzem nas células hospedeiras DNA plasmidial (plasmídeo Ti) que passam a governar geneticamente a multiplicação dessas células da planta, induzindo-as a uma multiplicação autônoma e contínua e que não mais obedecem às leis morfogenéticas da diferenciação, emanadas da planta (BECKER, 1979; DRUMMOND, 1979; KADO, 1976). Da multiplicação anômala das células tumorais (células hospedeiras que receberam DNA bacteriano) resulta a galha, que histologicamente é constituída por um tecido parenquimatoso desorganizado, com células hipertrofiadas e hiperplásticas entremeadas com segmentos de vasos orientados ao acaso (BARNES, 1968; DRUMMOND, 1979). Células hospedeiras isentas de *A. tumefaciens*, mas que tenham recebido o material genético dessa bactéria através da transformação onco^gênica (células tumorais), podem ser mantidas indefinidamente em culturas de tecido, sem adição de hormônios de planta. Fragmentos dessas culturas, quando enxertados em plantas compatíveis, sadias, reproduzem galhas (BRAUN, 1962; DRUMMOND, 1979).

3.1.3. Interação *Meloidogyne* spp. x *A. tumefaciens*

Sinergismo entre fitonematóides e elementos da microflora do solo ocorre com muita frequência em plantas doentes e seus efeitos sobre a etiologia, epidemiologia, dinâmica de população e ecologia de ambos os organismos são muito marcantes (MOUNTAIN, 1965). Segundo POWELL (1971), "a natureza

não trabalha com cultura pura", de modo que, quando os nemat^oides das galhas penetram nas raízes, outros microrganismos do solo também os acompanham e influenciam no grau de infecção. Dados que ilustram bem este fato são fornecidos por MAYOL e BERGESON (1970), constatando que, quando tomateiros foram inoculados com 6.000 larvas de *M. incognita* em condições sépticas, 75% do peso da folhagem e 48% do peso das raízes foram reduzidos, porém, ao ser inoculado o mesmo número de larvas, em condições assépticas, a redução da parte aérea foi de apenas 37% e o peso das raízes, ao invés de diminuir, aumentou em cerca de 50%. SLACK (1963) também reforça a opinião de POWELL (1971), quando sugere que no interior do solo não existe relacionamento entre apenas um único organismo e a planta. Nas doenças de partes subterrâneas, vários microrganismos geralmente tomam parte. POWELL (1963) chama a atenção para o fato de que, quando nemat^oides das galhas e outros organismos fazem parte de um complexo etiológico, geralmente surgem sérios problemas com relação à diagnose e controle da enfermidade, sendo necessária a identificação dos agentes causais para o planejamento de um programa de controle adequado, onde normalmente, a combinação de práticas complementares torna-se indispensável. A ocorrência simultânea de nemat^oides do gênero *Meloidogyne* e *A. tumefaciens* em uma mesma planta já foi reportada por diferentes autores (ESSER et alii, 1968; GRIFFIN et alii, 1968; NIGH, 1966; ORION e ZUTRA, 1971).

NIGH (1966) relatou que plantas de pêssego tor-

nam-se mais suscetíveis ao ataque de *A. tumefaciens*, na presença de *M. javanica* e que ocorre também um aumento no número de galhas provocadas pelo citado nematóide, na presença dessa bactéria.

GRIFFIN et alii (1968) constataram que cultivares de framboesa suscetíveis a *M. hapla* desenvolvem galhas da coroa na presença desse nematóide e de *A. tumefaciens*, enquanto que, cultivares resistentes ao nematóide não formam galhas da coroa, mesmo na presença de ambos (*M. hapla* e *A. tumefaciens*).

Segundo ORION e ZUTRA (1971), em raízes de amendoeira, somente se desenvolvem galhas da coroa quando *M. javanica* e *A. tumefaciens* estão presentes conjuntamente e que, na presença de apenas *A. tumefaciens*, não há formação de galhas da coroa.

De acordo com o trabalho de DHANVANTARI et alii (1975), *M. hapla*, *M. incognita* e *Pratylenchus penetrans* desempenham um papel significativo na predisposição da planta a doença provocada por *A. tumefaciens* em pêssigo, atuando como agentes aceleradores, já que em um curto período de incubação (62 dias), a injúria provocada pelos nematóides favorece o aumento da infecção, enquanto que, em tempo de incubação mais longo, este efeito não foi observado. Esses autores também afirmaram que *A. tumefaciens* é capaz de penetrar na planta sem o auxílio de agentes provocadores de ferimentos, embora demore mais tempo para o estabelecimento da doença.

Embora DHANVANTARI et alii (1975) e KERR (1972) tenham sugerido que *A. tumefaciens* seja capaz de penetrar em plantas na ausência de ferimentos, a grande maioria dos autores consideram que essa bactéria necessita de ferimentos para infectar a planta (BANFIELD, 1934; BARNES, 1968; BRAUN, 1962; DE RAPP, 1951; McKEEN, 1954; RIKER et alii, 1946).

3.2. Cultivos *in vitro* de fitonematóides

O primeiro cultivo de fitonematóides *in vitro*, em condições gnotobióticas, data de 1914, quando BYARS conseguiu a multiplicação e manutenção de nematóides das galhas (*Meloidogyne* sp.) por um período superior a um mês, sobre plantas de feijão-macassar e de tomate, vegetando em tubos de ensaio. Depois do trabalho de BYARS (1914), até 1955, salvo em alguns e esparsos trabalhos (BARKER, 1948; HASTINGS e BOSHER, 1938; TYLER, 1933), a Gnotobiologia praticamente não foi utilizada em pesquisas com fitonematóides.

Com o advento e o aperfeiçoamento da técnica de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais, a Gnotobiologia passou a ter grande aplicação na Nematologia Vegetal. MOUNTAIN (1955) foi quem primeiro utilizou a técnica de cultura de tecidos vegetais no cultivo de nematóides. Esse pesquisador cultivou *Pratylenchus minyus*, *in vitro*, sobre culturas assépticas de raízes decepadas de milho, fumo e trevo vermelho.

Outro grande avanço na técnica de cultivo gnotobiótico de fitonematóides, ocorreu em 1960, quando KRUSBERG cultivou duas espécies de nematóides em culturas de calos vegetais.

Atualmente, existem várias técnicas para se cultivar fitonematóides em condições gnotobióticas. Com exceção da cultura axênica em meio oligídico, que pode ser utilizada para o cultivo de algumas espécies de nematóides de plantas, todas as outras técnicas são baseadas em culturas duplas, nas quais o nematóide é cultivado sobre uma outra cultura, que pode ser de calos, de raízes decepadas ou de plantas e, para alguns nematóides, sobre culturas de fungos.

Apesar de a maioria dos fitonematóides ser considerada parasita obrigatório, não podendo ser cultivada *in vitro* na ausência de células vivas, algumas espécies já foram cultivadas em meio de cultura oligídico (tabela 1).

Existem algumas espécies de fitonematóides de hábito miceliófago, que podem ser cultivadas sobre culturas de fungos (tabela 2).

O surgimento e o desenvolvimento da técnica de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais permitiram, com eficiência, o cultivo de fitonematóides sobre culturas de calos e de raízes decepadas. Sabe-se que, células, tecidos e fragmentos de órgãos vegetais, quando colocados em meios de cultura especiais e em condições ambientes controladas, podem resultar na multiplicação desordenada de células (formação de

calos); na organização e multiplicação de partes da planta (raízes, caules e folhas) e na diferenciação total e perfeita de toda a planta, igual à planta doadora do explante.

Culturas *in vitro* de raízes decepadas podem ser obtidas através da transferência de extremidades de raízes com um a dois centímetros de comprimento, para meio nutritivo específico. Muitos trabalhos já foram realizados pela utilização de culturas duplas de raízes decepadas e nematóides (tabela 3).

Depois dos trabalhos de KRUSBERG (1960, 1961), que introduziram o uso de cultura de calos vegetais para o cultivo de fitonematóides, a multiplicação e manutenção, em condições gnotobióticas, de várias espécies, passaram a ser rotineiras em diversos laboratórios de Nematologia. Muitos pesquisadores já utilizaram culturas duplas de calos e nematóides, para atender à pesquisas com as mais diversas finalidades (tabela 4).

O cultivo de nematóides sobre plantas cultivadas em condições gnotobióticas pode ser feito no interior de recipientes fechados ou em câmaras assépticas especiais. Vários cultivos de fitonematóides, em condições gnotobióticas, foram feitos sobre plantas mantidas no interior de frascos de vidro fechados (tabela 5). Esta técnica, quando feita de maneira tradicional, apresenta o inconveniente da falta de espaço vital para a planta, devido ao seu crescimento rápido (FERRAZ, 1978). TREXLER e REYNOLDS (1957) desenvolveram um tipo

de câmara asséptica que permite a manutenção de plantas em condições gnotobióticas por longo tempo, prestando-se bem para cultivos de nematóides (HANOUNIK e OSBORNE, 1975; MOODY e LOWNSBERY, 1976). Diversos nematologistas (tabela 5) ao utilizarem diferentes equipamentos, fizeram cultivos gnotobióticos de fitonematóides sobre plantas que cresciam em recipientes onde mantinham apenas o sistema radicular em ambiente estéril.

Cultivos de nematóides podem ser feitos também em órgãos de reservas como, tubérculos de batata, discos de cenoura, raízes de reserva, mantidos em condições livres de organismos contaminantes (BARKER, 1948; MOODY et alii , 1973 ; O'BANNON e TAYLOR, 1968; THORNE, 1961).

Tabela 1. Cultivos axênicos de fitonematóides

PESQUISADORES	NEMATÓIDES
BUECHER <u>et alii</u> (1970)	<i>Aphelenchoides</i> sp.
HANSEN <u>et alii</u> (1970)	<i>Aphelenchus avenae</i>
HANSEN <u>et alii</u> (1972)	<i>Aphelenchus avenae</i>
HANSEN <u>et alii</u> (1973)	<i>Aphelenchus avenae</i>
MYERS (1967a)	<i>Aphelenchoides sacchari</i> = <i>A. rutgersi</i>
MYERS (1967b)	<i>Aphelenchoides sacchari</i> = <i>A. rutgersi</i>
MYERS (1968)	<i>Aphelenchoides</i> sp.
MYERS <u>et alii</u> (1971)	<i>Aphelenchoides</i> sp.
MYERS e BALASUBRAMANIAN (1971)	<i>Aphelenchoides</i> sp.
MYERS e BALASUBRAMANIAN (1973)	<i>Aphelenchoides rutgersi</i>
THIRUGNANAM (1976)	<i>Aphelenchoides rutgersi</i>

Tabela 2. Culturas monoxênicas de fitonematóides sobre fungos

PESQUISADORES	FUNGOS	NEMATÓIDES
BARKER (1964)	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aphelenchus avenae</i>
CASTILLO e KRUSBERG (1971)	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Ditylenchus triformis</i>
COLE e KRUSBERG (1967)	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Ditylenchus triformis</i>
CUTLER e KRUSBERG (1968)	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Ditylenchus triformis</i>
DARLING et alii (1957)	37 espécies de fungos re- presentando 15 gêneros	<i>Ditylenchus destructor</i>
DONCASTER (1966)	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Ditylenchus destructor</i> , <i>Ditylenchus myceliophagus</i>
EVANS e FISHER (1970)	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aphelenchus avenae</i>
FAULKNER e DARLING (1961)	64 espécies, representan- do 40 gêneros de fungos	<i>Ditylenchus destructor</i>

continua

Tabela 2. Continuação

PESQUISADORES	FUNGOS	NEMATÓIDES
GUPTA et alii (1979)	<i>Pythium middletonii</i>	<i>Aphelenchus avenae</i>
HECHLER (1962)	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Aphelenchus avenae</i>
HUANG et alii (1972)	<i>Fusarium solani</i>	<i>Aphelenchoides besseyi</i>
HUANG et alii (1979)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aphelenchoides besseyi</i>
HUSSEY e KRUSBERG (1971)	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Ditylenchus triformis</i>
KEETCH (1974)	<i>Botrytis</i> spp.	<i>Aphelenchus avenae</i>
KLINE (1976)	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Aphelenchus avenae</i>
KRUSBERG (1967a)	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Ditylenchus triformis</i>
KRUSBERG (1967b)	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Ditylenchus triformis</i>

continua

Tabela 2. Continuação

PESQUISADORES	FUNGOS	NEMATÓIDES
MYERS e KRUSBERG (1965)	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Ditylenchus triformis</i> <i>Ditylenchus myceliophagus</i>
PILLAI e TAYLOR (1967)	9 espécies de fungos	<i>Ditylenchus triformis</i> <i>Neotylenchus linfordi</i> <i>Aphelenchus avenae</i> <i>Paraphelenchus acontioides</i>
SAVAGE e FISHER (1966)	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Tylenchus hexalineatus</i>
SIKORA (1975)	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Ditylenchus myceliophagus</i> <i>Aphelenchus avenae</i> <i>Aphelenchoides composticola</i>
TOWNSHEND (1964)	56 espécies de fungos	<i>Aphelenchus avenae</i> <i>Bursaphelenchus fungivorus</i>
TOWNSHEND e BLACKITH (1975)	43 espécies de fungos	<i>Aphelenchus avenae</i>
VIGLIERCHIO (1971)	<i>Verticillium theobromae</i> <i>Cladosporium</i> spp.	<i>Ditylenchus dipsaci</i>

Tabela 3. Culturas monoxênicas de nematóides sobre raízes decepadas

PESQUISADORES	ORIGEM DAS RAÍZES	NEMATÓIDES
BOSWELL (1963)	Milho	<i>Pratylenchus brachyurus</i>
DARLING et alii (1957)	Trevo Tomate	<i>Ditylenchus destructor</i>
DASGUPTA et alii (1970)	Sorgo	<i>Hoplolaimus indicus</i>
DROPKIN e BOONE (1966)	Tomate	<i>Meloidogyne incognita acrita</i> <i>M. incognita incognita</i> <i>M. arenaria</i> <i>M. javanica javanica</i> <i>M. hapla</i>
ELIZABETH WIDDOWSON et alii (1958)	Tomate	<i>Heterodera rostochiensis</i>
FASSULIOTIS (1975)	Alfafa	<i>Hoplolaimus columbus</i>
FEDER (1958)	Quiabo	<i>Radopholus similis</i>

Continua

Tabela 3. . Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DAS RAIZES	NEMATÓIDES
JOHNSON e VIGLIERCHIO (1969a)	Beterraba	<i>Heterodera schachtii</i>
JOHNSON e VIGLIERCHIO (1969b)	Beterraba	<i>Heterodera schachtii</i>
McCLURE e VIGLIERCHIO (1966a)	Pepino	<i>Meloidogyne incognita</i>
McCLURE e VIGLIERCHIO (1966b)	Pepino	<i>Meloidogyne incognita</i>
MORIARTY (1964)	Beterraba	<i>Heterodera schachtii</i>
MOUNTAIN (1955)	Milho Fumo Trevo Vermelho	<i>Pratylenchus minyus</i>
"MÜLLER (1978)	Nabo	<i>Heterodera schachtii</i>
OWE e CORBETT (1976)	Milho	<i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Pratylenchus zeae</i>

continua

Tabela 3. Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DAS RAÍZES	NEMATÓIDES
PEACOCK (1959)	Tomate	<i>M. incognita</i>
PRASAD e WEBSTER (1967)	Tomate	<i>Nacobbus serendipiticus</i>
SCHROEDER (1963)	Milho	<i>Pratylenchus penetrans</i>
SCHROEDER e JENKINS (1963)	11 espécies de plantas	<i>Pratylenchus penetrans</i>
TINER (1960)	Milho	<i>Pratylenchus penetrans</i>
TINER (1961)	Milho	<i>Pratylenchus penetrans</i>

Tabela 4. Culturas monoxênicas de nematóides sobre calos vegetais

PESQUISADORES	ORIGEM DOS CALOS	NEMATÓIDES
BARKER (1963)	Fumo Gramma-azul	<i>Aphelenchus avenae</i>
BARKER e DARLING (1965)	Cenoura Fumo Tomate Pervinca	<i>Aphelenchus avenae</i>
BINGEFORS e BINGEFORS (1976)	Alfafa Trevo vermelho Fumo	<i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Ditylenchus destructor</i> <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> <i>Aphelenchoides fragariae</i>
CHITWOOD e KRUSBERG (1977)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
COLE e KRUSBERG (1967)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>

continua

Tabela 4.. Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DOS CALOS	NEMATÓIDES
CUTLER e KRUSBERG (1968)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
DARLING et alii (1957)	Batata Cenoura Trevo Fumo	<i>Ditylenchus destructor</i>
DOLLIVER et alii (1962)	Fumo Cenoura Tomate Uva Cravo de defunto Vinca Girassol Margarida	<i>Aphelelenchoides ritzemabosi</i>
DUNN (1973)	Alfafa	<i>Pratylenchus penetrans</i>
FAULKNER et alii (1974)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>

continua

Tabela 4. Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DOS CALOS	NEMATÓIDES
FAULKNER e DARLING (1961)	Cenoura Batata Trevo Fumo	<i>Ditylenchus destructor</i>
HUSSEY e KRUSBERG (1968)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
HUSSEY e KRUSBERG (1971)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
INSERRA e O'BANNON (1975)	Cítrus	<i>Radopholus similis</i> <i>Pratylenchus coffeae</i>
KHERA e ZUCKERMAN (1962)	Alfafa	<i>Tylenchus agricola</i> <i>Tylenchorhynchus claytoni</i>
KRUSBERG (1960)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>

continua

Tabela 4. Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DOS CALOS	NEMATÓIDES
KRUSBERG (1961)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Pratylenchus zeae</i> <i>Pratylenchus penetrans</i> <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> <i>Tylenchorhynchus capitatus</i> <i>Hoplolaimus coronatus</i>
KRUSBERG (1963)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
KRUSBERG (1967a)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
KRUSBERG (1967b)	Alfafa	<i>Pratylenchus penetrans</i> <i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> <i>Tylenchorhynchus claytoni</i>
KRUSBERG e BLICKENSTAFF (1964)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Pratylenchus penetrans</i> <i>Pratylenchus zeae</i>

continua

Tabela 4. Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DOS CALOS	NEMATÓIDES
LOWNSBERY et alii (1967)	Alfafa	<i>Pratylenchus vulnus</i>
MILLER (1963)	Tomate	<i>Meloidogyne hapla</i>
	Pepino	<i>Meloidogyne incognita acrita</i>
MYERS e KRUSBERG (1965)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
		<i>Pratylenchus penetrans</i>
MYERS et alii (1965)	Pomelo	<i>Radopholus similis</i>
	Quiabo	
	Alfafa	
PARACER e ZUCKERMAN (1967)	Milho	<i>Dolichodorus heterocephalus</i>
RIEDEL e MAI (1971a)	Cebola	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
RIEDEL e MAI (1971b)	Cebola	<i>Ditylenchus dipsaci</i>

continua

Tabela 4. Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DOS CALOS	NEMATÓIDES
SAVAGE e FISHER (1966)	Alfafa Tanchagem Alamo	<i>Tylenchus hexalineatus</i>
SAYRE e HWANG (1975)	Alfafa	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
SCHROEDER e JENKINS (1963)	Couve Alface Pepino Feijão Ervilha Soja Alfafa Aipo Pimenta Cebola Centeio	<i>Pratylenchus penetrans</i>
STARR e MAI (1976)	Alfafa	<i>Pratylenchus penetrans</i>

continua

Tabela 4. Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DOS CALOS	NEMATÓIDES
TAMURA e MAMIYA (1975)	Alfafa	<i>Bursaphelenchus lignicolus</i>
TAMURA e MAMIYA (1979)	Pinus	<i>Bursaphelenchus lignicolus</i>
TARTE e MAI (1976a)	Alfafa	<i>Pratylenchus penetrans</i>
TARTE e MAI (1976b)	Alfafa	<i>Pratylenchus penetrans</i>
TOWNSHEND (1974)	Trevo branco	<i>Paratylenchus projectus</i>
VIGLIERCHIO (1971)	Cebola	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
VIGLIERCHIO e CROLL (1968)	Cebola Alfafa Trevo branco Trevo vermelho	<i>Ditylenchus dipsaci</i>

continua

Tabela 4. Continuação

PESQUISADORES	ORIGEM DOS CALOS	NEMATÓIDES
VIGLIERCHIO et alii (1973)	Cebola Feijão-fava Aveia Centeio Alfafa Trevo vermelho Trevo branco	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
WEBSTER (1966)	Aveia Cebola	<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>
WEBSTER (1967)	Alfafa	<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>
WEBSTER e LOWE (1966)	Alfafa Trevo vermelho Batata Maçã Ervilha Rosa Nabo	<i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>

Tabela 5. Cultivos de fitonematóides em plantas inteiras sob condições gnotobióticas

PESQUISADORES	PLANTAS	NEMATÓIDES	MÉTODOS
BROWN (1974)	Trigo	<i>Heterodera avenae</i>	No interior de recipientes fechados
BYARS (1914)	Tomate Feijão-macassar	<i>Heterodera radicicola</i> = <i>Meloidogyne</i> sp.	"
DROPKIN e WEBB (1967)	Tomate	<i>Meloidogyne incognita acrita</i>	"
DROPKIN et alii (1967)	Tomate	<i>Meloidogyne incognita acrita</i>	"
OYEKAN et alii (1972)	Ervilha	<i>Pratylenchus penetrans</i>	"
POLYCHRONOPOULOS e LOWNSBERY (1968)	Beterraba	<i>Heterodera schachtii</i>	"
ROSSNER (1971)	Trevo vermelho Alfafa	<i>Rotylenchus robustus</i>	"
SAWHNEY e WEBSTER (1975)	Tomate	<i>Meloidogyne incognita</i>	"

Tabela 5. Continuação

PESQUISADORES	PLANTAS	NEMATÓIDES	MÉTODOS
TYLER (1933)	Tomate	<i>Heterodera marioni</i> = = <i>Meloidogyne</i> sp.	No interior de recipientes fechados
DEN OUDEN (1960)	-	-	Em recipientes que mantêm ape- nas o sistema radicular em condições gnotobióticas
FELDMESSER (1967)	Tomate	<i>Meloidogyne incognita</i>	"
	Citrus	<i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Radopholus similis</i>	"
MAYOL e BERGESON (1970)	Tomate	<i>Meloidogyne incognita</i>	"
ZUCKERMAN e BRZESKI (1965a)	Milho	<i>Hemicycliophora similis</i>	"
	Feijão	<i>Pratylenchus penetrans</i>	
	Pepino	<i>Trichodorus christiei</i>	
	Tomate	<i>Tylenchorhynchus claytoni</i>	

continua

Tabela 5. Continuação

PESQUISADORES	PLANTAS	NEMATÓIDES	MÉTODOS
ZUCKERMAN e BRZESKI (1965b)	Feijão	<i>Tylenchorhynchus claytoni</i>	Em recipientes que mantêm ape- nas o sistema radicular em condições gnotobióticas
	Tomate	<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>	
	Brócolos	<i>Pratylenchus penetrans</i>	
	Rabanete	<i>Tylenchus</i> sp.	
	Pepino	<i>Hemicycliophora zuckermani</i>	
	Milho	<i>Meloidogyne hapla</i>	
	Azevém	<i>Trichodorus christiei</i>	
	Loureiro- -de-jardim		
HANOUNIK e OSBORNE (1975)	Fumo	<i>Meloidogyne incognita</i>	No interior de câmaras assép- ticas especiais
MOODY e LOWNSBERRY (1976)	Ameixa	<i>Pratylenchus vulnus</i>	"

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Histologia de galhas da coroa infestadas por *M. incognita*

Foram estudadas as alterações histológicas provocadas por *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949 em tecidos de galhas da coroa induzidas por *Agrobacterium tumefaciens* (Smith e Townsend) Conn. em plantas de chuchu (*Sechium edule* Sw.).

4.1.1. Obtenção, multiplicação e preparação do inóculo de *M. incognita*

A população de *M. incognita* utilizada foi oriuno

da de uma muda de cafeeiro (*Coffea arabica* L. 'Mundo Novo'), severamente atacada por esse nematóide e multiplicada em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. 'Santa Cruz'), a partir de uma única ooteca. Inicialmente, foi retirada, sob binocular, uma ooteca de *M. incognita* do interior de uma galha da muda de cafeeiro e depositada sobre o sistema radicular de uma muda de tomateiro, cultivada em vaso de argila com solo esterilizado em autoclave (121°C, durante duas horas). Após 70 dias da inoculação, as raízes do tomateiro, apresentando galhas, foram trituradas e introduzidas, em partes iguais, em uma série de 10 vasos de argila (15 x 20cm) com tomateiros Santa Cruz (uma planta por vaso), com 15 dias de idade. Essas plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, para a multiplicação do inóculo. O solo utilizado nos vasos compunha-se de uma mistura de terriço e areia, na proporção de 1:1, previamente esterilizada a 121°C, por duas horas. Após 35 dias da inoculação da série de tomateiros multiplicadores do nematóide, procedeu-se a coleta conjunta dos sistemas radiculares, para a extração dos ovos de *M. incognita*, que serviram como inóculo para as plantas de chuchu. Com o auxílio de uma binocular, extraíram-se ootecas do interior das galhas, colocando-se-as em um tubo de ensaio que continha água destilada estéril.

A substância matriz que envolvia os ovos foi dissolvida com hipoclorito de sódio a 1%, sob agitação manual, durante cinco minutos, segundo o método descrito por HUSSEY e BARKER (1973). A concentração da suspensão de ovos, utiliza-

da como inóculo, era de 2.000 ovos e foi calculada com o auxílio da câmara de contagem de Peter. Para a suspensão final dos ovos do nematóide, usou-se água destilada estéril.

4.1.2. Preparação do inóculo e método de inoculação de *A. tumefaciens*

O isolado de *A. tumefaciens* usado foi o IBSP-133, preservado por liofilização e cedido pela Secção de Bacteriologia do Instituto Biológico de São Paulo. A bactéria foi cultivada em tubos de ensaio, contendo meio sólido inclinado, com a seguinte composição: Bacto triptona 5g; extrato de carne 5g; glicose 1g; fosfato dibásico de potássio 1g; ágar 18g e água deionizada estéril 1.000ml.

A suspensão bacteriana foi feita com água destilada estéril, utilizando-se culturas com 72 horas de crescimento, à temperatura de 28°C.

Efetuuou-se a inoculação de cada planta de chuchu, através de ferimentos feitos com uma agulha estéril, ao nível do colo da planta e se os cobriu depois com cinco camadas de gase umedecida com a suspensão bacteriana. Sobre as camadas de gase colou-se um plástico com fita adesiva, para propiciar condições de umidade saturada, nos primeiros cinco dias, após a inoculação.

4.1.3. Sequência das inoculações de *A. tumefaciens* e de *M. incognita* nas plantas de chuchu

Três plantas de chuchu com três meses de idade, cultivadas em vasos de argila (40 x 30cm), uma planta por vaso, contendo solo autoclavado a 121°C, durante duas horas, foram inoculadas com *A. tumefaciens*, de acordo com a metodologia descrita no item 4.1.2, e mantidas em casa-de-vegetação. Após oito meses da inoculação da bactéria, quando as plantas apresentavam galhas da coroa bem desenvolvidas, foi feita uma inoculação com cerca de 2.000 ovos de *M. incognita* em cada planta. A suspensão de ovos do nematóide foi depositada sobre a galha induzida pela bactéria e depois coberta com uma fina camada de solo.

4.1.4. Preparação de segmentos de galhas da coroa infestados pelo nematóide para as observações microscópicas

Decorridos três meses da inoculação do nematóide nas galhas da coroa das plantas de chuchu, procedeu-se a coleta de segmentos dessas galhas, para a preparação dos cortes histológicos. Após a coleta, os segmentos foram fixados em FAA (formalina 5ml; etanol 20ml; ácido acético glacial 1ml e água destilada 40 ml), desidratados em uma série de álcoois,

incluídos em parafina, cortados em micrótomo rotativo na espesura de 13µm, coloridos com safranina/fast green e montados com bálsamo do Canadá, para as observações microscópicas.

4.2. Desenvolvimento de dois sistemas de cultivo in vitro de M. javanica

Através da técnica de cultura de tecido, utilizando-se eixos embrionários como propágulos, foram produzidas 20 plantas inteiras e 20 sistemas radiculares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. 'Carioca'). Ovos de *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 foram introduzidos nos frascos erlenmeyers que continham plantas inteiras ou apenas sistemas radiculares e, depois de 32 dias, as galhas foram coletadas e preparadas para observações microscópicas.

4.2.1. Produção de sistemas radiculares a partir de culturas de eixo embrionário de feijoeiro

Eixos embrionários foram extraídos de sementes de feijoeiro e desinfetados externamente em solução de hipoclorito de sódio a 0,52%, durante 10 minutos e em seguida lavados com água deionizada estéril, por duas vezes consecutivas. Após a lavagem, semearam-se os eixos embrionários, em 20 fras-

cos erlenmeyers de 125ml (um eixo embrionário por frasco), contendo cada recipiente 50ml de meio E sólido, previamente esterilizado em autoclave a 121°C , durante 15 minutos. O meio E foi desenvolvido pelo Laboratório de Bioquímica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e tem a propriedade de induzir a formação de calos e posterior morfogênese de raiz em cultura de tecido, a partir de eixo embrionário de feijoeiro. Este meio apresenta a seguinte composição, por litro: Caseína 2g; sacarose 20g; inositol 0,1g; vitaminas (tiamina HCl 0,8g, piridoxina HCl 0,05g, niacinamida 0,125g, D-pantotenato 0,1g, H_2O 1.000ml) - 10ml; Na_2HPO_4 37,7mg; KI 0,05mg; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 173mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg; KNO_3 800mg; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4,5mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,4mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,25mg; KCl 200mg; CaCl_2 135mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8mg; Na_2 EDTA 37,3mg; cinetina 1mg; ácido indolacético (IAA) 5mg; pH 5,6 (CROCOMO et alii, 1979).

Após a semeadura dos eixos embrionários, os erlenmeyers foram mantidos, durante 15 dias, em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) e 12 horas de escuro ($\pm 20^{\circ}\text{C}$), para a formação e desenvolvimento dos sistemas radiculares. A desinfecção e a semeadura dos eixos embrionários realizaram-se em câmara asséptica.

4.2.2. Produção de plantas inteiras a partir de culturas de eixo embrionário de feijoeiro

Para a produção *in vitro* das 20 plantas inteiras de feijoeiro sob condições assépticas, a metodologia foi praticamente a mesma utilizada na produção de sistemas radiculares (item 4.2.1), havendo-se alterado apenas o meio de cultura. Para a formação das plantas inteiras, utilizou-se o meio E₂ cuja composição, por litro, difere da do meio E pelas quantidades de cinetina e de ácido indolacético (IAA), que no meio E₂ são de 0,25mg e 1,3mg, respectivamente.

4.2.3. Obtenção e multiplicação do nematóide (*M. javanica*)

O isolado de *M. javanica*, empregado nesta pesquisa, foi proveniente de uma única ooteca, extraída de galha de tomateiro infestado por esse parasita e multiplicado em feijoeiro. As cinco plantas multiplicadoras do nematóide foram cultivadas em vasos de argila (15 x 20cm), contendo solo esterilizado em autoclave a 121°C, por duas horas. Depois de inoculadas com *M. javanica*, as plantas em referência, foram deixadas em casa-de-vegetação, durante três meses, para a multiplicação do nematóide.

4.2.4. Preparação do inóculo de *M. javanica* e inoculação das plantas inteiras e dos sistemas radiculares originários de culturas de eixos embrionários de feijoeiro

Ootecas foram extraídas, sob binocular, de galhas das raízes dos feijoeiros multiplicadores do nematóide e depositadas em um erlenmeyer de 100ml, contendo 60ml de água deionizada estéril. A água contendo as ootecas foi adicionada no copo de um aparelho de filtração a vácuo (Sartorius Membranfilter GMBH), equipado com filtro de membrana, com poros de 3µm de diâmetro.

A dissolução da substância matriz que envolvia os ovos e a axenização destes foram feitas simultaneamente, através do tratamento sequenciado com as seguintes substâncias: 60ml de hipoclorito de sódio a 1% - 10 minutos; 30ml de penicilina a 0,1% + 30ml de estreptomicina a 0,1% - 40 minutos; 60ml de cetavlon a 0,05% - 7 minutos e quatro lavagens consecutivas com 60ml de água deionizada estéril. Decorrido o tempo estabelecido para cada substância, filtrava-se a a vácuo, e adicionava-se a substância seguinte. Após a última lavagem, os ovos foram suspensos em 50ml de água deionizada estéril, sob agitação manual. A inoculação constou de 1ml da suspensão de ovos (cerca de 600 ovos), adicionado através de pipeta em cada um dos 40 erlenmeyers que continham plantas inteiras ou apenas sistemas radiculares, produzidos *in vitro* em condições assépti

cas, com 15 dias de crescimento. Após a inoculação, os 20 erlenmeyers, encerrando apenas sistemas radiculares de feijoeiro, provenientes das culturas de embrião, foram colocados em câmara escura, durante os cinco primeiros dias e depois levados para a câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) e 12 horas de escuro ($\pm 20^{\circ}\text{C}$), onde permaneceram até 32 dias depois da inoculação. Depois da inoculação com o nematóide, cada erlenmeyer contendo planta inteira teve a parte basal envolvida com plástico preto e em seguida levado diretamente para a câmara de crescimento, com regulagens de fotoperíodo e temperatura iguais às utilizadas para as culturas de sistemas radiculares.

As operações de axenização e inoculação dos ovos do nematóide, foram realizadas no interior de câmara asséptica. O aparelho de filtração foi previamente envolvido em papel alumínio e autoclavado a 121°C , durante 30 minutos. A retirada do papel alumínio procedeu-se dentro da câmara asséptica, momentos antes da sua utilização.

4.2.5. Preparação de galhas das plantas inteiras e dos sistemas radiculares produzidos *in vitro* para as observações histológicas

Objetivando-se avaliar o comportamento de *M. javanica* no interior de raízes de plantas inteiras e de siste-

mas radiculares produzidos *in vitro*, realizaram-se observações histológicas de galhas produzidas nos dois referidos substratos. Trinta e dois dias depois da inoculação do nematóide, as plantas inteiras e os sistemas radiculares foram retirados dos erlenmeyers e suas raízes exibindo galhas, coletadas, fixadas em FAA, desidratadas em uma série de álcoois, incluídas em parafina, e por fim, cortadas na espessura de 13µm, em micrôtomo rotativo. Coloriram-se os cortes com safranina/fast green e se os montaram com bálsamo do Canadá para as observações microscópicas.

4.2.6. Preparação de raízes com galhas, de feijoeiros desenvolvidos em solo, para as observações histológicas

Foram feitas comparações histológicas entre galhas produzidas nos dois sistemas de cultivo *in vitro*, com galhas desenvolvidas em raízes de plantas vegetando em solo. Utilizando a metodologia descrita no ítem 4.2.5, preparou-se cortes histológicos de galhas de raízes de feijoeiro desenvolvidos em solo e infestados por *M. javanica*, para servirem de comparação para os cortes histológicos de galhas produzidas *in vitro*. Esses feijoeiros serviram para a multiplicação do inóculo de *M. javanica* (item 4.2.3).

5. RESULTADOS

5.1. Histologia de galhas da coroa infestadas por *M. incognita*

As plantas de chuchu inoculadas com *A. tumefaciens*, produziram na região da inoculação, grandes galhas de formato irregular e de textura mais ou menos mole e úmida. Os estudos histológicos revelaram que *M. incognita* ao ser inoculada nessas galhas, penetraram e reproduziram-se em seu interior.

Nas observações microscópicas de cortes de galhas da coroa infestadas por *M. incognita*, constatou-se grande quantidade de conjuntos de três a cinco células gigantes, dis-

tribuídas ao redor das extremidades anterior de fêmeas do nematóide. As células gigantes provocadas pelo nematóide nos tecidos de galhas da coroa, tinham aspecto semelhante àquele exibido por este tipo de células, induzidas em raízes. Apresentavam parede espessa, citoplasma denso, granuloso e numerosos núcleos hipertrofiados e esféricos (figuras 1 e 2). No interior de cada núcleo, era sempre visível um nucléolo esférico, refringente e hipertrofiado. Os conjuntos de células gigantes encontravam-se, geralmente, circundados por uma espessa região diferenciada, constituída por camadas de elementos condutores curtos e anômalos, que se mostravam orientados, quase sempre, no sentido radial às células gigantes (figura 1). Essa região apresentava-se bem delimitada e era constituída, predominantemente, por elementos do floema, os quais exibiam áreas crivosas bem características (figuras 1 e 2). Muitas vezes, esses elementos condutores anormais, apresentavam diâmetros maiores do que os das células hipertrofiadas e hiperplásticas do tecido da galha da coroa, ao redor (figuras 1 e 2). Quando vários conjuntos de células gigantes encontravam-se próximos uns aos outros, observava-se uma única região condutora bem delimitada, que ao mesmo tempo envolvia e separava esses conjuntos (figura 2). Fêmeas adultas bem desenvolvidas (figura 3) e ootecas com larvas, mostraram-se frequentes.

Nas regiões da galha da coroa não infestadas pelo nematóide, observou-se desorganização dos tecidos, hipertrofia e hiperplasia das células e vasos descontínuos orientados ao acaso.

5.2. Cultivos in vitro de M. javanica

As plantas inteiras e os sistemas radiculares produzidos *in vitro*, apresentaram grandes quantidades de raízes.

A eficiência dos dois sistemas de cultivo *in vitro* para *M. javanica*, desenvolvidos neste trabalho, foi traduzida pela presença de galhas com fêmeas, células gigantes e ootecas bem desenvolvidas. A grande produção de galhas e de ovos, verificada nas observações histológicas, indicam que, as condições nutricionais e ambientes desses dois substratos (plantas inteiras e sistemas radiculares) foram favoráveis à multiplicação desse nematóide.

M. javanica quando inoculada tanto em culturas *in vitro* de plantas inteiras como de sistemas radiculares, as larvas do segundo estágio penetravam nas raízes e induziam a formação de galhas e células gigantes (figuras 5 e 6). Não foi observado diferenças no desenvolvimento desta espécie de nematóide nos dois sistemas de cultivo testados e todos os resultados aqui relatados foram encontrados nos dois tipos de cultivo.

Muitas vezes, formavam-se galhas em raízes dotadas de geotropismo negativo, que cresciam externamente ao substrato (raízes aéreas) (figura 4). O aparecimento de galhas visíveis a olho nu, ocorreu entre o quarto e o décimo dia, após a inoculação dos ovos do nematóide.

Cortes histológicos de galhas, feitos aos 32 dias depois da inoculação, revelaram a presença de fêmeas adultas associadas a conjuntos de três a seis células gigantes e a massas de ovos (figuras 5, 6 e 10). As fêmeas mostravam-se bem desenvolvidas e localizavam-se, geralmente, na região cortical da galha (figuras 5 e 6), embora, tenham-se observado fêmeas se desenvolvendo, inteiramente, no interior do cilindro central da raiz (figura 7). As células gigantes situavam-se ao redor da parte anterior do nematóide (figuras 5 e 6) e exibiam todas as características daquelas induzidas por este nematóide, em raízes de feijoeiro, vegetando em solo (figura 8). Essas células não apresentavam vacúolo central, eram cheias por um citoplasma denso e granuloso e exibiam numerosos núcleos, mais ou menos esféricos, hipertrofiados e dispersos na massa citoplasmática (figura 9). Cada núcleo exibia no seu interior um grande nucléolo de formato esférico. Massas de ovos associadas a fêmeas eram frequentes (figura 10).

As culturas de sistemas radiculares infestados por *M. javanica*, permaneceram desenvolvendo-se, por um período superior a 80 dias, possibilitando a ocorrência de uma segunda geração do nematóide. As plantas inteiras produzidas *in vitro* e inoculadas com o nematóide, apresentaram um crescimento muito vagaroso e, na maioria das vezes, aos 40 dias de idade, não tinham atingido a altura da tampa do frasco erlenmeyer de 125ml (11cm) que as continha. As plantas inteiras começavam a definhar ao redor dos 50 dias de idade e a maioria morreu antes de completar 60 dias.

Fig. 1. Corte de galha da coroa de planta de chuchu, induzida por *A. tumefaciens* e infestada por *M. incognita*. Conjunto de células gigantes circundado por uma região condutora, constituída de elementos condutores anômalos, orientados radialmente às células gigantes. Observa-se a predominância de elementos do floema, exibindo áreas crivosas. (92,6 X).

Fig. 2. Corte de galha da coroa de planta de chuchu, induzida por *A. tumefaciens* e infestada por *M. incognita*. Con juntos de células gigantes próximos uns aos outros, envolvidos e separados por uma única região condutora. (92,6 X)

Fig. 3. Fêmea adulta de *M. incognita* associada a um conjunto de células gigantes, no interior de galha da coroa de planta de chuchu induzida por *A. tumefaciens*. (92,6 X)

Fig. 4. Planta inteira de feijoeiro desenvolvida em meio E_2 , a partir de cultura de eixo embrionário, aos 47 dias de idade e após 32 dias da inoculação de *M. javanica*. Observam-se galhas em raízes aéreas. (92,6 X)

Fig. 5. Corte longitudinal de uma galha, induzida por *M. javanica* em raiz de planta inteira de feijoeiro, produzida *in vitro*, a partir de eixo embrionário semeado em meio E_2 . Verifica-se que a fêmea está na região cortical da galha, associada a um conjunto de células gigantes, localizado no cilindro central. (92,6 X)

Fig. 6. Fêmea de *M. javanica* associada a um conjunto de células gigantes, no interior de galha de sistema radicular produzido em meio E, a partir de eixo embrionário de feijoeiro. O aspecto das células gigantes é semelhante ao exibido por este tipo de célula, induzida em raiz de feijoeiro desenvolvido em solo. (92,6 X)

Fig. 7. Corte longitudinal de raiz de planta inteira de feijoeiro, produzida a partir de eixo embrionário semeado em meio E_2 , mostrando fêmea jovem de *M. javanica* em forma de salsicha, associada a um conjunto de células gigantes. O nematóide está localizado totalmente no interior do cilindro central da raiz. (92,6 X)

Fig. 8. Células gigantes formadas no interior de galha de raiz de feijoeiro, desenvolvido em solo. (92,6 X)

Fig. 9. Corte transversal de raiz de planta inteira produzida *in vitro*, através da sementeira de eixo embrionário em meio E_2 . Nota-se que as células gigantes localizam-se na região central da raiz. As células gigantes são semelhantes àsquelas induzidas em raiz de feijoeiro desenvolvido em solo. (92,6 X)

Fig. 10. Corte longitudinal de uma galha induzida em sistema radicular produzido *in vitro*, através da sementeira de eixo embrionário de feijoeiro em meio E. Resto do corpo de uma fêmea adulta, localizada no cilindro central, associada a uma ooteca. (92,6 X)

6. DISCUSSÃO

6.1. Histologia de galhas da coroa infestadas por *M. incognita*

Em raízes, os nematóides do gênero *Meloidogyne* induzem a formação de células gigantes a partir de células meristemáticas do pleroma e às vezes do periblema. Essas células meristemáticas, quando influenciadas pelo nematóide, não mais se diferenciam em cilindro central ou córtex, e sim, dão origem às células gigantes (BIRCHFIELD, 1965; CHRISTIE, 1936; DROPKIN e NELSON, 1960; ENDO, 1971; HUANG e MAGGENTI, 1969; KRUSBERG e NIELSEN, 1958; MENDES et alii, 1977; SIDDIQUI, 1971a). No caso de galhas da coroa induzidas por *A. tumefa-*

ciens, os tecidos são completamente diferentes daqueles do meristema terminal da raiz. Essas galhas são estruturadas por células tumorais, ou seja, por células que receberam um adicional genético da bactéria — DNA plasmidial — e o tecido da galha da coroa é constituído por células parenquimatosas hipertrofiadas e hiperplásticas, entremeadas por segmentos de vasos deformados, orientados ao acaso (BARNES, 1968; BRAUN, 1959; KADO, 1976). O nematóide, ao penetrar na galha da coroa, provavelmente injeta suas secreções esofageanas sobre células tumorais jovens em intensa multiplicação do que deve resultar na formação das células gigantes. Interpreta-se, por tanto, que as células gigantes sejam oriundas de células já modificadas pela ação da bactéria.

Analisando-se a constância com que as células gigantes são induzidas em raízes, ao nível do cilindro central ou conectadas com ele (MENDES et alii, 1976a; 1976b; 1977; 1978c) e a observação, segundo a qual, quando células gigantes eventualmente são formadas na região cortical da raiz, elas são quase sempre, pequenas, em pequeno número e associadas a fêmeas mal desenvolvidas (MENDES e CARDOSO, 1978a; MENDES et alii, 1977), pode-se deduzir que os vasos condutores são imprescindíveis para a nutrição das células gigantes. Mesmo quando os nematóides das galhas infestam rizomas, tubérculos, caules, folhas e nódulos de leguminosas induzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*, as células gigantes são formados ao nível dos feixes vasculares (COLBRAN, 1961; FASSULIOTIS e

DEAKIN, 1973; HUANG, 1966; JENKINS e BIRD, 1962; KRUSBERG e NIELSEN, 1958; MENDES et alii, 1978b; MILLER e DiEDWARDO 1962; TAHA e RASKI, 1969; TAYLOR, 1976; WONG e WILLETTS 1969). Este fato reforça a idéia de que as células gigantes são tipos de células de transferência multinucleadas, especializadas em conduzir nutrientes do sistema vascular da raiz para o nematóide, o qual funciona como um receptor metabólico (BIRD, 1978; BIRD e LOVEYS, 1975; JONES e DROPKIN, 1975; JONES e DROPKIN, 1976; JONES e NORTHCOTE, 1972; JONES et alii, 1975; McCLURE, 1977). Em galhas da coroa, como não existe um sistema vascular estruturado, o próprio nematóide parece provocar a formação de um sistema condutor especial (região condutora) (figuras 1 e 2), para carrear nutrientes dos tecidos da galha da coroa para as células gigantes e, conseqüentemente, para o nematóide. A região condutora deve também ser formada a partir de células tumorais.

É importante salientar o marcante poder indutivo das secreções esofageanas de *Meloidogyne* spp., que são capazes de induzir a formação de células gigantes e outras alterações, em tecidos de diversos órgãos (raiz, tubérculo, rizoma, caule e folha) e em tecidos de outras estruturas formadas sob a influência de diferentes organismos, como se verificam em nódulos de leguminosas e em galhas da coroa.

Baseando-se nas observações histológicas realizadas neste trabalho e na literatura consultada, pode-se inter

pretar que, pela infecção de *A. tumefaciens*, as células hospedeiras são modificadas pelo adicional genético proveniente dessa bactéria o qual determina o aparecimento de um novo tecido (tecido da galha da coroa) (BECKER, 1979; DRUMMOND, 1979) e que este, mais uma vez, é modificado pela ação das secreções do nematóide, para originar as células gigantes e a região condutora que envolve essas células (figuras 1 e 2).

Quando nematóides do gênero *Meloidogyne* penetram em raízes, uma das primeiras respostas da planta é a produção de galhas (ENDO, 1971), porém, quando esses parasitas infestam galhas da coroa, a formação destas estruturas pela ação do nematóide não se verifica. A galha do nematóide (abaulamento da raiz) parece servir, primariamente, para proteger as fêmeas e as ootecas no interior da raiz. No caso de infecção de galha da coroa, esta proteção é dada pelos tecidos da galha hospedeira.

A presença no interior de galhas da coroa, de grande número de fêmeas e conjuntos de células gigantes bem desenvolvidos (figuras 1, 2 e 3) e a ocorrência de grandes e numerosas ootecas revelam que *M. incognita* encontra nos tecidos de galhas da coroa de plantas de chuchu, condições nutricionais e ambientes químico e físico apropriados, que lhe permite desenvolver-se com sucesso no interior dessas estruturas. Analisando-se a estreita relação existente entre a planta, a bactéria e o nematóide, supõe-se que, ao longo do processo evolutivo, estes três associados sofreram um elevado grau de adap

tação. Segundo McNEW (1960), os organismos formadores de galhas, de que são exemplos os nematóides do gênero *Meloidogyne* e *A. tumefaciens*, estão entre os parasitas de plantas mais evoluídos e, conseqüentemente, entre os de mais baixa patogenicidade, provocando enfermidade enquadrada no grupo 6 de sua classificação de doenças (doenças que interferem na utilização dos produtos sintetizados pela planta). Em virtude de ambos os patógenos prejudicarem a planta hospedeira, primariamente, pela retirada de nutrientes, presume-se que, a doença causada pelo complexo etiológico formado por *Meloidogyne* spp. e *A. tumefaciens*, deve exaurir a planta de uma maneira muito mais drástica do que a doença provocada por apenas um desses dois organismos isoladamente.

Levando-se em consideração que *A. tumefaciens* necessita de ferimentos para infectar o hospedeiro (BANFIELD, 1934; BARNES, 1968; BRAUN, 1962; DE RAPP, 1951; McKEEN, 1954; RIKER et alii, 1946) e que, os nematóides das galhas ferem a planta quando penetram; considerando-se a constatação feita por vários autores (DHANVANTARI et alii, 1975; GRIFFIN et alii, 1968; NIGH, 1966; ORION e ZUTRA, 1971) de que estes nematóides são importantes ou mesmo indispensáveis para o estabelecimento das galhas da coroa; considerando-se ainda, a elevada afinidade existente entre *M. incognita* e os tecidos da galha da coroa, constatada neste trabalho, conclui-se que, estes nematóides, além de provocarem ferimentos que possibilitam a infecção da planta pela bactéria, devem interagir também com

A. tumefaciens, ao nível bioquímico e/ou fisiológico, alterando a patogênese. Tudo está a indicar que existe uma perfeita interação entre o nematóide e as células tumorais induzidas pela bactéria. Essas células respondem prontamente a estímulos emanados do nematóide, para a formação das células gigantes e da região condutora, favorecendo assim, o estabelecimento do nematóide no interior das galhas da coroa.

6.2. Cultivos *in vitro* de *M. javanica*

Atualmente, diferentes espécies de fitonematóides podem ser cultivadas *in vitro* com relativa facilidade. Técnicas simples e eficientes como cultivos de fitonematóides em meios oligídicos ou em culturas duplas utilizando-se culturas de fungos ou de calos vegetais, fazem parte, com frequência, da metodologia de muitas investigações nematológicas (tabelas 1, 2 e 4).

Os nematóides dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera* não se multiplicam bem, em culturas de calos (ZUCKERMAN, 1971). Nematóides desses dois gêneros exigem a presença de raízes em crescimento ativo para a sua multiplicação. O cultivo gnotobiótico de *Meloidogyne* spp. é atualmente feito sobre plantas ou sobre culturas de raízes decepadas (tabelas 3 e 5).

A multiplicação de nematóides das galhas, quando feita sobre raízes de plantas desenvolvendo-se no interior

de recipientes fechados, em condições estéreis, apresenta o inconveniente da falta de espaço vital, devido ao rápido crescimento da planta. Cultivos desses nematóides em plantas mantidas no interior de câmaras assépticas especiais, apresentam a desvantagem da dificuldade de aquisição do equipamento, em virtude da não disponibilidade no comércio, desses tipos de câmaras. Alguns pesquisadores já idealizaram e utilizaram, em cultivos de *Meloidogyne* spp., instrumentos que mantêm apenas o sistema radicular da planta em condições assépticas. Esses equipamentos são de construção complexa e como não são fabricados para serem vendidos, geralmente o próprio pesquisador é que tem que os construir.

O cultivo de nematóides das galhas *in vitro* sobre culturas de raízes decepadas, é o método mais usado para a multiplicação desses parasitas, embora apresente baixa produção de raízes laterais e conseqüentemente de meristemas terminais, que são os locais de penetração das larvas. Este problema pode ser minimizado pela utilização de muitos segmentos de extremidades de raízes na preparação das culturas, porém, este procedimento aumenta o risco de contaminação microbiana.

Como vimos, todos os métodos empregados para o cultivo dos nematóides das galhas, apresentam certos inconvenientes, o que faz com que, esses nematóides não sejam cultivados *in vitro*, com a mesma facilidade dos nematóides que são multiplicados e mantidos sobre culturas de fungos ou de calos.

A presença de galhas com fêmeas adultas, células gigantes e ootecas, em abundância e bem desenvolvidas (figuras 5, 6, 7, 9 e 10), traduzem as boas condições ambientes e nutricionais encontradas pelo parasita no interior das raízes das culturas *in vitro* de plantas inteiras e de sistemas radiculares.

A observação da ocorrência de uma segunda geração do nematóide, feita através do aparecimento de novas galhas depois de 30 dias da inoculação, também indica o sucesso de *M. javanica* desenvolvendo-se sobre culturas de sistemas radiculares.

O uso de culturas de sistema radicular de feijoeiro para o cultivo de *M. javanica* é mais vantajoso que o uso de plantas inteiras, em virtude das primeiras permanecerem desenvolvendo-se por tempo mais longo, possibilitando a ocorrência de duas gerações do nematóide, e pela possibilidade de ser repicado para meios de cultura novos.

Embora McCLURE e VIGLIERCHIO (1966a) tenham verificado que a penetração de *M. incognita* em culturas de raízes decepadas, seja independente do número de sítios de infestação disponível, é lógico admitir que, quanto maior o número de meristemas terminais (locais de penetração) maior a quantidade de larvas que penetram. SAYRE (1958) sugeriu que o número de locais disponíveis das raízes pode ser um fator limitante à penetração das larvas. Sabe-se que a locomoção de nematóides é muito vagarosa, cerca de 1cm em 24 horas, logo, a pro

babilidade das larvas encontrarem meristemas terminais de raízes, cresce com o aumento do número de raízes. Esta interpretação independe de outros fatores que contribuem para a penetração das larvas, como condições nutricionais e atração pelas raízes.

A multiplicação de *M. javanica* sobre plantas inteiras e sobre sistemas radiculares descrita nesta pesquisa, apresenta as seguintes vantagens, quando comparada com o método usual de cultivo dos nematóides das galhas em culturas de raízes decepadas: 1) maior produção de raízes e 2) menor risco de contaminação microbiana, já que se utiliza apenas um eixo embrionário como propágulo.

O crescimento vagaroso demonstrado pelas plantas inteiras, representa uma vantagem, em virtude de não tornar o espaço interno limitante em pouco tempo. Sugere-se a realização de futuras pesquisas utilizando-se quantidades maiores de meio de cultura (meio E₂) e o uso de frascos erlenmeyers maiores, o que poderão proporcionar melhores condições para o desenvolvimento das plantas inteiras e conseqüentemente, para o nematóide em suas raízes.

Estes dois sistemas de cultivo poderão ser empregados com outras plantas e com outras espécies de *Meloidogyne*, desde que existam meios de cultura apropriados para a indução de morfogênese de raiz e/ou regeneração de toda a planta, a partir de embrião ou de outros explantes.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1) *M. incognita* penetra, induz células gigantes e reproduz-se bem no interior de galhas da coroa de plantas de chuchu, induzidas por *A. tumefaciens*.

2) *M. incognita* provoca o aparecimento de uma região condutora ao redor das células gigantes, que se formam no interior de galhas da coroa.

3) As células gigantes, induzidas por *M. incog-*

nita no interior de galhas da coroa, são semelhantes às induzidas em raízes.

4) As células gigantes e a região condutora, induzidas por *M. incognita* no interior de galhas da coroa, são formadas a partir de células tumorais.

5) *M. javanica* penetra, induz células gigantes semelhantes às induzidas em raízes desenvolvidas em solo e reproduz-se bem, nos dois sistemas de cultivo *in vitro*, desenvolvidos neste trabalho.

6) O cultivo de *M. javanica*, sobre sistema radicular de feijoeiro produzido *in vitro*, oferece maiores vantagens do que o outro sistema sobre plantas inteiras.

7) Os dois sistemas de cultivo *in vitro*, idealizados neste trabalho, proporcionam maior produção de raízes e menor risco de contaminação microbiana, do que o cultivo *in vitro* tradicional, sobre raízes decepadas.

8. SUMMARY

Seedlings of *Sechium edule* were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* and as soon the plants presented well developed crown galls, they were inoculated with *Meloidogyne incognita*. Three months later segments of crown galls were collected and preposed for histological examination for the purpose of studying biological aspects of the plant-bacteria-nematode complex.

Microscopic exams of crown gall sections showed a great number of giant cell sets (3 - 5) which were found associated with the female nematodes. The sets of giant cells were always found laying in a thick differentiated region formed of layers of short and malformed conducting elements

almost always radially disposed to the giant cells. These giant cells had some similar characteristics as those exhibited by this type of cells when induced in roots.

Due to the inexistence of any structured vascular system in the crown galls, it was interpreted that still more than inducing the formation of giant cells, the nematodes also promoted the appearance of the conducting region which involves groups of these cells.

The conducting region probably aids in the transport of nutrients from the crown gall tissue to the giant cells. It is also suggested that the giant cells as well as the conducting region are induced by the nematode from crown gall cells already altered by bacterial action (the tumor cells).

M. incognita established itself very well producing a large number of egg masses inside the crown galls induced by *A. tumefaciens* in the host plant.

Two systems for rearing *M. javanica* were developed. Whole plants and root systems of beans (*Phaseolus vulgaris* 'Carioca') were produced in erlenmeyer flasks (125ml) from cell cultures obtained from embryo axis. When the plants and the root systems were 15 days old, they were inoculated with eggs of *M. javanica* and 32 days after inoculation, galls were collected and treated for histological observations.

Embryo cultures in media E₂ and E respectively

were used for the *in vitro* obtention of whole plant and root cultures. When medium E₂ is inoculated with the bean embryo, it causes a total and perfect differentiation of the plant and medium E brings about the production of callus and future root morphogenesis from the embryo axis of this legume.

No differences in development of *M. javanica* were observed in either whole plants or roots alone produced *in vitro*, but the use of the root system is more advantageous.

In both substrates the nematode larvae penetrated and induced gall and giant cell formation. Galls became visible between the forth and tenth day after inoculation.

Histological sections of galls collected from the roots of whole plants and root system cultures 32 days after inoculation with eggs of *M. javanica* revealed the presence of well developed adult females, giant cells and egg masses. The giant cells were similar to those induced by this nematode in bean roots growing in soil.

The root system cultures infested by the nematode grew for more than 80 days and those from whole plants had a very retarded growth.

The advantages of these two systems of *M. javanica* rearing are the production of a great number of roots and the minimum risk of contamination when compared to rearing of the nematode on excised roots.

9. LITERATURA CITADA

- BANFIELD, W.M., 1934. Life history of the crown gall organism in relation to its pathogenesis on the red raspberry. J. Agric. Res., 48:761-787.
- BARKER, A.D., 1948. Some notes on experimental infestation of potato tubers with the potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945. Rep. ent. Soc. Ont., 78: 32-39.
- BARKER, K.R., 1963. Parasitism of tobacco callus and kentucky bluegrass by *Aphelenchus avenae*. Phytopathology, 53:870.

- BARKER, K.R., 1964. On the disease reduction and reproduction of the nematode *Aphelenchus avenae* on isolates of *Rhizoctonia solani*. Pl. Dis. Repr., 48:428-432.
- BARKER, K.R. e H.M.DARLING, 1965. Reproduction of *Aphelenchus avenae* on plant tissues in culture. Nematologica, 11:162-166.
- BARNES, E.H., 1968. Atlas and manual of plant pathology. New York, Appleton-Century-Crofts. 325 p.
- BECKER, W., 1979. Plant molecular biology comes of age. Nature, 280:719-720.
- BINGEFORS, S. e S. BINGEFORS, 1976. Rearing stem nematode inoculum for plant breeding purposes. Swedish J. Agric. Res., 6:13-17.
- BIRCHFIELD, W., 1965. Host-parasite relations and host range studies of a new *Meloidogyne* species in Southern USA. Phytopathology, 55:1359-1361.
- BIRD, A.F., 1978. Root-knot nematodes in Australia. Melbourne, CSIRO. 26 p. (CSIRO, Division of Horticultural Research Technical Paper n° 2).

- BIRD, A.F. e B.R.LOVEYS, 1975. The incorporation of photosynthates by *Meloidogyne javanica*. J. Nematol., 7: 111-113.
- BOSWELL, T.E., 1963. A method for separation and sterilization of *Pratylenchus brachyurus* from mixed populations of nematodes. Phytopathology, 53:622 (Abstr.).
- BRAUN, A.C., 1943. Studies on tumor inception in the crown-gall disease. Am. J. Bot., 30:674-677.
- BRAUN, A.C., 1957. A physiological study on the nature of autonomous growth in neoplastic plant cells. Symp. Soc. Exp. Biol., 11:132-142.
- BRAUN, A.C., 1959. Growth is affected. In: HORSFALL, J.G. e A.E. DIMOND, ed. Plant Pathology an Advanced Treatise. New York, Academic Press. v. 1, p. 189-248.
- BRAUN, A.C., 1962. Tumor inception and development in the crown gall disease. Ann. Rev. Pl. Physiol., 13:533 - 558.
- BROWN, J.A.M., 1974. Test tube reproduction of *Heterodera avenae* on resistant and susceptible wheats. Nematologica, 20:192-203.
- BUECHER, E.J.; E.L.HANSEN e R.F. MYERS, 1970. Continuous

axenic culture of *Aphelenchoides* sp. J. Nematol., 2:189-190.

BYARS, L.P., 1914. Preliminary notes on the cultivation of the plant parasitic nematode, *Heterodera radicicola*. Phytopathology, 4:323-326.

CASTILLO, J.M. e L.R.KRUSBERG, 1971. Organic acids of *Ditylenchus triformis* and *Turbatrix aceti*. J. Nematol., 3:284-288.

CHITWOOD, D.J. e L.R.KRUSBERG, 1977. Pectolytic enzymes in three populations of *Ditylenchus dipsaci*. J. Nematol., 9:187-192.

CHRISTIE, J.R., 1936. The development of root-knot nematode galls. Phytopathology, 26:1-22.

COLBRAN, R.C., 1961. Root-knot of ginger. Queensland J. Agric. Sci., 87:546-547.

COLE, R.J. e L.R.KRUSBERG, 1967. Sterol composition of the nematodes *Ditylenchus triformis* and *Ditylenchus dipsaci*, and host tissues. Expl. Parasit., 21:232-239.

- CROCOMO, O.J.; L.A.GALLO; GENI S. TONIN e NANJI SACCHI, 1979. Developmental control of *Phaseolus vulgaris* using embryo axis culture. Energ. Nucl. Agric., Piracicaba, 1:55-58.
- CUTLER, H.G. e L.R.KRUSBERG, 1968. Plant growth regulators in *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus triformis* and host tissues. Pl. Cell Physiol., 9:479-497.
- DARLING, H.M.; L.R.FAULKNER e P. WALLENDAL, 1957. Culturing the potato rot nematode. Phytopathology, 47:7 (Abstr.).
- DASGUPTA, D.R.; S. NAND e A.R. SESHADRI, 1970. Culturing, embriology and life history studies on the lance nematode, *Hoplolaimus indicus*. Nematologica, 16:235-248.
- DEN OUDEN, H., 1960. An improved method for making thin agar layers in polyethylene bags. Nematologica, 5:255-259.
- DE RAPP, R.S., 1951. The crown gall problem. Bot. Rev., 17: 629-670.
- DHANVANTARI, B.N.; P.W. JOHNSON e V.A. DIRKS, 1975. The role of nematodes in crown gall infection of peach in Southwestern Ontario. Pl. Dis. Reprtr., 59:109-112.
- DOLLIVER, J.S.; A.C. HILDEBRANDT e A.J. RIKER, 1962. Studies of reproduction of *Aphelenchoides ritzemabosi* (SCHWARTZ)

on plant tissues in culture. Nematologica, 7:294-300.

DONCASTER, C.C., 1966. Nematode feeding mechanisms. 2. Observations on *Ditylenchus destructor* and *D. myceliophagus* feeding on *Botrytis cinerea*. Nematologica, 12:417 - 427.

DROPKIN, V.H. e W.R. BOONE, 1966. Analysis of host-parasite relationships of root-knot nematodes by single-larva inoculations of excised tomato roots. Nematologica, 12: 225-236.

DROPKIN, V.H. e P.E.NELSON, 1960. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. Phytopathology, 50:442-447.

DROPKIN, V.H. e R.E.WEBB, 1967. Resistance of axenic tomato seedlings to *Meloidogyne incognita acrita* and to *M. hapla*. Phytopathology, 57:584-587.

DROPKIN, V.H.; D.W. DAVIS e R.E. WEBB, 1967. Resistance of tomato to *Meloidogyne incognita acrita* and to *M. hapla* (root-knot nematodes) as determined by a new technique. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 90:316-323.

DRUMMOND, M., 1979. Crown gall disease. Nature, 281:343-347.

- DUNN, R.A., 1973. Extraction of eggs of *Pratylenchus penetrans* from alfalfa callus and relationship between age of culture and yield of eggs. J. Nematol., 5:73-74.
- ELIZABETH WIDDOWSON; C.C. DONCASTER e D.W. FENWICK, 1958.
Observations on the development of *Heterodera rostochiensis* Woll. in sterile root cultures. Nematologica, 3:308-314.
- ENDO, B.Y., 1971. Nematode induced syncytia (giant cells).
Host parasite relationships of Heteroderidae. In:
ZUCKERMAN, B.M.; W.F. MAI e R.A. ROHDE, ed. Plant Parasitic Nematodes. N. York, Academic Press, 2:69-85.
- ESSER, R.P.; A.P. MARTINEZ e K.R. LANGDON, 1968. Simultaneous occurrence of root-knot nematode and crown gall bacteria. Pl. Dis. Reprtr., 52:550-553.
- EVANS, A.A.F. e J.M. FISHER, 1970. Some factor affecting the number and size of nematodes in populations of *Aphelenchus avenae*. Nematologica, 16:295-304.
- FASSULIOTIS, G., 1975. Feeding, egg-laying, and embryology of the Columbia lance nematode, *Hoplolaimus columbus*. J. Nematol., 7:152-158.

- FASSULIOTIS, G. e J.R. DEAKIN, 1973. Stem galls on root-knot nematode resistant snap beans. J. Am. Soc. Hort. Sci., 98:425-427.
- FAULKNER, L.R. e H.M. DARLING, 1961. Pathological histology, hosts, and culture of the potato rot nematode. Phytopathology, 51:778-786.
- FAULKNER, L.R.; D.B. BOWER; D.W. EVANS e J.H. ELGIN Jr., 1974. Mass culturing of *Ditylenchus dipsaci* to yield large quantities of inoculum. J. Nematol., 6:126-129.
- FEDER, W.A., 1958. Aseptic culture of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on excised okra root tissues. Phytopathology, 48:392-393.
- FELDMESSER, J., 1967. An in vitro technique for nematode inoculation and culture of plants. Nematologica, 13:141-142.
- FERRAZ, S., 1978. O uso de culturas gnotobióticas no estudo de fitonematóides. In: III Reunião Brasil. Nemat. Mossoró, p. 37-54. (Resumos dos trabalhos científicos e conferências).
- GRIFFIN, G.D.; J.L. ANDERSON e E.C. JORGENSEN, 1968. Interaction of *Meloidogyne hapla* and *Agrobacterium tumefaciens* in relation to raspberry cultivars. Pl. Dis. Repr., 52:492-493.
- GUPTA, M.C.; R.S. SINGH e K.A. SITARAMAIAH, 1979. A new endoparasitic fungus on *Xiphinema* and cultivation of

Rhabditis spp. and *Aphelenchus avenae* on same fungus.
Nematologica, 25:142.

HANOUNIK, S.B. e W.W. OSBORNE, 1975. Influence of *Meloidogyne incognita* on the content of amino acids and nicotine in tobacco grown under gnotobiotic conditions. J. Nematol., 7:332-336.

HANSEN, E.L.; E.J. BUECHER e A.A.F. EVANS, 1970. Axenic culture of *Aphelenchus avenae*. Nematologica, 16:328-329.

HANSEN, E.L.; E.J. BUECHER e E.A. YARWOOD, 1972. Sex differentiation of *Aphelenchus avenae* in axenic culture. Nematologica, 18:253-260.

HANSEN, E.L.; E.J. BUECHER e E.A. YARWOOD, 1973. Alteration of sex of *Aphelenchus avenae* in culture. Nematologica, 19: 113-116.

HASTINGS, R.J. e J.E. BOSHER, 1938. A study of the pathogenicity of the meadow nematode and associated fungus *Cylindrocarpon radicicola* Wr., Can. J. Res., 16:225-229.

HECHLER, H.C., 1962. The development of *Aphelenchus avenae* Bastian, 1865 in fungus culture. Proc. helminth. Soc. Wash., 29:162-167.

- HUANG, C.S., 1966. Host-parasite relationships of the root knot nematode in edible ginger. Phytopathology, 56:755-759.
- HUANG, C.S. e A.R. MAGGENTI, 1969. Wall modifications in developing giant cells of *Vicia faba* and *Cucumis sativus* induced by root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. Phytopatology, 59:931-937.
- HUANG, C.S.; S.P. HUANG e Y.C. CHIANG, 1979. Mode of reproduction and sex ratio of rice white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. Nematologica, 25:255-260.
- HUANG, C.S.; S.P. HUANG e L.H. LIN, 1972. The effect of temperature on development and generation periods of *Aphelenchoides besseyi*. Nematologica, 18:432-438.
- HUSSEY, R.S. e K.R. BARKER, 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Pl. Dis. Reprtr., 57:1025-1028.
- HUSSEY, R.S. e L.R. KRUSBERG, 1968. Histopathology of resistant reactions in Alasca pea seedlings to two populations of *Ditylenchus dipsaci*. Phytopathology, 58:1305-1310.
- HUSSEY, R.S. e L.R. KRUSBERG, 1971. Disc-electrophoretic patterns of enzymes and soluble proteins of *Ditylenchus dipsaci* and *D. triformis*. J. Nematol., 3:79-84.

- INSERRA, R.N. e J.H. O'BANNON, 1975. Rearing migratory endoparasitic nematodes in citrus callus and roots produced from citrus leaves. J. Nematol., 7:261-263.
- JENKINS, W.R. e G.W. BIRD, 1962. Nematodes associated with wild yam, *Dioscorea* sp. with special reference to the pathogenicity of *Meloidogyne incognita*. Pl. Dis. Rept., 46:858-860.
- JOHNSON, R.N. e D.R. VIGLIERCHIO, 1969a. Sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*) reared on axenic *Beta vulgaris* root explants. I. Selected environmental factors affecting penetration. Nematologica, 15:129-143.
- JOHNSON, R.N. e D.R. VIGLIERCHIO, 1969b. Sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*) reared on axenic *Beta vulgaris* root explants. II. Selected environmental and nutritional factors affecting development and sex-ratio. Nematologica, 15:144-152.
- JONES, M.G.K. e V.H. DROPKIN, 1975. Cellular alterations induced in soybean roots by three endoparasitic nematodes. Physiol. Plant Pathology, 5:119-124.
- JONES, M.G.K. e V.H. DROPKIN, 1976. Scanning electron microscopy of nematode-induced giant transfer cells. Cytobios, 15:149-161.

- JONES, M.G.K. e D.H. NORTHCOTE, 1972. Multinucleate transfer cells induced in coleus roots by the root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. Protoplasma, 75:381-395.
- JONES, M.G.K.; A. NOVACKY e V.H. DROPKIN, 1975. Transmembrane potentials of parenchyma cells and nematode-induced transfer cells. Protoplasma, 85:15-37.
- KADO, C.I., 1976. The tumor-inducing substance of *Agrobacterium tumefaciens*. Ann. Rev. Phytopathol., 14:265-308.
- KEETCH, D.P., 1974. The effect of nematicides on feeding posture and dispersal of *Aphelenchus avenae*. Nematologica, 20:107-118.
- KERR, A., 1972. Biological control of crown gall: seed inoculation. J. Appl. Bact., 35:493-497.
- KHERA, S. e B.M. ZUCKERMAN, 1962. Studies on the culturing of certain ectoparasitic nematodes on plant callus tissue. Nematologica, 8:272-274.
- KLINE, J.P., 1976. Morphometric variation in *Aphelenchus avenae* with varied nutrition and time. Nematologica, 22:94-102.
- KRUSBERG, L.R., 1960. Culturing, histopathology and biochemistry

of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfalfa tissues. Phytopathology, 50:643.

KRUSBERG, L.R., 1961. Studies on the culturing and parasitism of plant-parasitic nematodes, in particular *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfalfa tissues. Nematologica, 6:181-200.

KRUSBERG, L.R., 1963. Effect of galling by *Ditylenchus dipsaci* on pectins in alfalfa. Nematologica, 9:341-346.

KRUSBERG, L.R., 1967a. Pectinases in *Ditylenchus dipsaci*. Nematologica, 13:443-451.

KRUSBERG, L.R., 1967b. Analyses of total lipids and fatty acids of plant-parasitic nematodes and host tissues. Comp. Biochem. Physiol., 21:83-90.

KRUSBERG, L.R. e M.L. BLICKENSTAFF, 1964. Influence of plant growth regulating substances on reproduction of *Ditylenchus dipsaci*, *Pratylenchus penetrans* and *Pratylenchus zeae* on alfalfa tissue cultures. Nematologica, 10:145-150.

KRUSBERG, L.R. e L.W. NIELSEN, 1958. Pathogenesis of root-knot nematodes to the Porto Rico variety of sweet potato. Phytopathology, 48:30-39.

LOWNSBERY, B.F.; C.S. HUANG e RUTH N. JOHNSON, 1967. Tissue culture and maintenance of the root-lesion nematode, *Pratylenchus vulnus*. Nematologica, 13:390-394.

- MAYOL, P.S. e G.B. BERGESON, 1970. The role of secondary invaders in *Meloidogyne incognita* infection. J. Nematol., 2:80-83.
- McCLURE, M.A., 1977. *Meloidogyne incognita*: a metabolic sink. J. Nematol., 9:88-90.
- McCLURE, M.A. e D.R. VIGLIERCHIO, 1966a. Penetration of *Meloidogyne incognita* in relation to growth and nutrition of sterile, excised cucumber roots. Nematologica, 12:237-247.
- McCLURE, M.A. e D.R. VIGLIERCHIO, 1966b. The influence of host nutrition and intensity of infection on the sex ratio and development of *Meloidogyne incognita* in sterile agar cultures of excised cucumber roots. Nematologica, 12:248-258.
- McKEEN, W.E., 1954. A study of cane and crown galls on Vancouver-Island and a comparison of the causal organisms. Phytopathology, 44:651-655.
- McNEW, G.L., 1960. The nature, origin, and evolution of parasitism. In: HORSFALL, J.G. e A.E. DIMOND, ed. Plant Pathology, An Advanced Treatise. New York, Academic Press. v. 2, p. 19-69.

- MENDES, B.V. e C.O.N. CARDOSO, 1978a. Algumas observações histopatológicas de raízes de ipê roxo parasitadas por *Meloidogyne arenaria*. Summa Phytopathologica, 4:49-54.
- MENDES, B.V.; J.B.N. ELKE CARDOSO e E.R. FERNANDES, 1978b. Observações histológicas do ataque de *Meloidogyne javanica* sobre nódulos de feijoeiro induzidos por *Rhizobium phaseoli*. Soc. Brasil. Nemat., 3:99-107.
- MENDES, B.V.; J.B.N. ELKE CARDOSO e E.R. FERNANDES, 1978c. Histopatologia de raízes de feijoeiro parasitadas por *Meloidogyne javanica*. Soc. Brasil. Nemat., 3:109-115.
- MENDES, B.V.; S.FERRAZ e C.SHIMOYA, 1976a. Histopatologia de raízes de cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne exigua*; possíveis locais de alimentação da fêmea adulta. Fitopatologia (ALF), 11:62-65.
- MENDES, B.V.; S.FERRAZ e C.SHIMOYA, 1976b. Histopatologia de raízes de cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne exigua*. I. Formação das células gigantes. Summa Phytopathologica, 2:97-102.
- MENDES, B.V.; S.FERRAZ e C.SHIMOYA, 1977. Observações histopatológicas de raízes de cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887. Soc. Brasil. Nemat., 2:207-229.

- MILLER, C.W., 1963. A method of obtaining *Meloidogyne* spp. in aseptic cultures. Phytopathology, 53:350-351 (Abstr.).
- MILLER, H.N. e A.A. DiEDWARDO, 1962. Leaf galls on *Siderasis fuscata* caused by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita incognita*. Phytopathology, 52:1070-1073.
- MOODY, E.H. e B.F. LOWNSBERY, 1976. Effects of *Pratylenchus vulnus* on the gnotobiotic growth of Myrobalan plum seedlings. Phytopathology, 66:1276-1278.
- MOODY, E.H.; B.F. LOWNSBERY e J.M. AHMED, 1973. Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. J. Nematol., 5:225-226.
- MORIARTY, F., 1964. The monoxenic culture of best eelworm (*Heterodera schachtii* Schm.) on excised roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Parasitology, 54:289-293.
- MOUNTAIN, W.B., 1955. A method of culturing plant parasitic nematodes under sterile conditions. Proc. Helminth. Soc. Wash., 22:49-52.
- MOUNTAIN, W.B., 1965. Pathogenesis by soil nematodes. In: BAKER, K.F. et alii ed. Ecology of Soil - Borne Plant Pathogens. Berkeley, University of California Press. p. 285-301.

- MÜLLER, J., 1978. L'élevage monoxénique d'*Heterodera Schachtii* sur crucifères et son application pour la sélection des plantes résistantes. Rev. Nématol., 1:47-52.
- MYERS, R.F., 1967a. Axenic cultivation of plant parasitic nematodes. Nematologica, 13:323.
- MYERS, R.F., 1967b. Axenic cultivation of *Aphelenchoides sacchari* Hooper. Proc. helminth. Soc. Wash., 34:251-255.
- MYERS, R.F., 1968. Nutrient media for plant parasitic nematodes. I. Axenic cultivation of *Aphelenchoides* sp. Expl. Parasit., 23:96-103.
- MYERS, R.F. e M. BALASUBRAMANIAN, 1971. Nutrient media for plant-parasitic nematodes. II. Amino acid requirements of *Aphelenchoides* sp., Exp. Parasitol., 29:330-336.
- MYERS, R.F. e M. BALASUBRAMANIAN, 1973. Nutrient media for plant-parasitic nematodes. V. Amino acid nutrition of *Aphelenchoides rutgersi*. Exp. Parasitol., 34:123-131.
- MYERS, R.F.; E.J. BUECHER e E.L. HANSEN, 1971. Oligidic medium for axenic culture of *Aphelenchoides* sp. J. Nematol., 3: 197-198.

- MYERS, R.F.; W.A. FEDER e P.C. HUTCHINS, 1965. The rearing of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on grapefruit, okra, and alfalfa root callus tissues. Proc. helminth. Soc. Wash., 32:94-95.
- MYERS, R.F. e L.R. KRUSBERG, 1965. Organic substances discharged by plant-parasitic nematodes. Phytopathology, 55:429-437.
- NIGH, Jr. E.L., 1966. Incidence of crown gall infection in peach as affected by the javanese root knot nematode. Phytopathology, 56:150. (Abstr.).
- O'BANNON, J.H. e A.L. TAYLOR, 1968. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. Phytopathology, 58:385.
- OLWE, T. e D.C.M. CORBETT, 1976. Aspects of the biology of *Pratylenchus brachyurus* and *P. zae*. Nematologica, 22:202-211.
- ORION, D. e D. ZUTRA, 1971. The effect of the root-knot nematode on the penetration of crown gall bacteria into almond roots. Israel J. Agric. Res., 21:27-29.
- OYEKAN, P.O.; C.D. BLAKE e J.E. MITCHELL, 1972. Histopathology of pea roots axenically infected by *Pratylenchus penetrans*. J. Nematol., 4:32-35.

- PARACER, S.M. e B.M. ZUCKERMAN, 1967. Monoxenic culturing of *Dolichodorus heterocephalus* on corn root callus. Nematologica, 13:478.
- PATE, J.S. e B.E.S. GUNNING, 1972. Transfer cells. Ann. Rev. Pl. Physiol., 23:173-196.
- PEACOCK, F.C., 1959. The development of a technique for studying the host/parasite relationship of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* under controlled conditions. Nematologica, 4:43-55.
- PILLAI, J.K. e D.P. TAYLOR, 1967. Influence of fungi on host preference, host suitability, and morphometrics of five mycophagous nematodes. Nematologica, 13:529-540.
- POLYCHRONOPOULOS, A.G. e B.F. LOWNSBERY, 1968. Effect of *Heterodera schachtii* on sugar beet seedlings under monoxenic conditions. Nematologica, 14:526-534.
- POWELL, N.T., 1963. The role of plant-parasitic nematodes in fungus diseases. Phytopathology, 53:28-35.
- POWELL, N.T., 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. Ann. Rev. Phytopathol., 9:253-274.

- PRASAD, S.K. e J.M. WEBSTER, 1967. Effect of temperature on the rate of development of *Nacobbus serendipiticus* in excised tomato roots. Nematologica, 13:85-90.
- RIEDEL, R.M. e W.F. MAI, 1971a. Pectinases in aqueous extracts of *Ditylenchus dipsaci*. J. Nematol., 3:28-38.
- RIEDEL, R.M. e W.F. MAI, 1971b. A comparison of pectinases from *Ditylenchus dipsaci* and *Allium cepa* callus tissue. J. Nematol., 3:174-178.
- RIKER, A.J.; E. SPOERL e E. ALICE GUTSCHE, 1946. Some comparisons of bacterial plant galls and of their causal agents. Bot. Rev., 12:57-82.
- ROSSNER, J., 1971. Sterile culture of plant parasitic nematodes in a hermetically sealed glass container. Nematologica, 17:320-321.
- SAVAGE, H.E. e K.D. FISHER, 1966. Host-parasite relations of *Tylenchus hexalineatus*. Phytopathology, 56:898 (Abstr.).

- SAWHNEY, R. e J.M. WEBSTER, 1975. The role of plant growth hormones in determining the resistance of tomato plants to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Nematologica, 21:95-103.
- SAYRE, R.M., 1958. Plant tissue culture as a tool in the study of the physiology of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* Chit., Diss. Abstr., 19:1185.
- SAYRE, R.M. e SHUH-WEI HWANG, 1975. Freezing and storing *Ditylenchus dipsaci* in liquid nitrogen. J. Nematol., 7: 199-202.
- SCHROEDER, P.H., 1963. Reproduction of *Pratylenchus penetrans* on corn roots cultured on various nutrient media. Phytopathology, 53:888-889.
- SCHROEDER, P.H. e W.R. JENKINS, 1963. Reproduction of *Pratylenchus penetrans* on root tissues grown on three media. Nematologica, 9:327-331.
- SIDDIQUI, I.A., 1971a. Histopathogenesis of galls induced by *Meloidogyne naasi* in oat roots. Nematologica, 17:237-242.
- SIDDIQUI, I.A., 1971b. Comparative penetration and development of *Meloidogyne naasi* in wheat and oat roots. Nematologica, 17:566-574.

- SIKORA, R.A., 1975. A technique for eliminating bacteria from mycophagous nematodes cultures. Nematologica, 21:116.
- SLACK, D.A., 1963. Symposium on interrelationships between nematodes and other agents causing plant diseases. Phytopathology, 53:27.
- STARR, J.L. e W.F. MAI., 1976. Effect of soil microflora on the interaction of three plant-parasitic nematodes with celery. Phytopathology, 66:1224-1228.
- TAHA, A.H.Y. e D.J. RASKI, 1969. Interrelationships between root-nodule bacteria, plant-parasitic nematodes and their leguminous host. J. Nematol., 1:201-211.
- TAMURA, H. e Y. MAMIYA, 1975. Reproduction of *Bursaphelenchus lignicolus* on alfalfa callus tissues. Nematologica, 21: 449-454.
- TAMURA, H. e Y. MAMIYA, 1979. Reproduction of *Bursaphelenchus lignicolus* on pine callus tissues. Nematologica, 25:149-151.

- TARTE, R. e W.F. MAI, 1976a. Morphological variation in *Pratylenchus penetrans*. J. Nematol., 8:185-195.
- TARTE, R. e W.F. MAI, 1976b. Sex expression and tail morphology of female progenies of smooth-tail and cremate-tail females of *Pratylenchus penetrans*. J. Nematol., 8:196-200.
- TAYLOR, D.P., 1976. Histopathology of *Meloidogyne* induced galls on the stems of raselle, *Hibiscus sabdariffa*. Nematologica, 22:219-221.
- THIRUGNANAM, M., 1976. *Aphelenchoides rutgersi*: Growth requirements for heme and purine nucleotides in crude chick embryo extract. Exp. Parasitol., 40:149-157.
- THORNE, G., 1961. Principles of nematology. New York, McGraw-Hill. 553 p.
- TINER, J.D., 1960. Cultures of the plant parasitic nematode genus *Pratylenchus* on sterile excised roots. I. Their establishment and maintenance. Expl. Parasit., 9:121-126.
- TINER, J.D., 1961. Cultures of the plant parasitic nematode genus *Pratylenchus* on sterile excised roots. II. A trap for collection on axenic nematodes and quantitative initiation of experiments. Expl. Parasit., 11:231-240.

- TOWNSHEND, J.L., 1964. Fungus hosts of *Aphelenchus avenae* Bastian, 1865 and *Bursaphelenchus fungivorus* Franklin & Hooper, 1962 and their attractiveness to these nematode species. Can. J. Microbiol., 10:727-737.
- TOWNSHEND, J.L., 1974. Monoxenic culture of *Paratylenchus projectus*. Nematologica, 20:264.
- TOWNSHEND, J.L. e R.E. BLACKITH, 1975. Fungal diet and the morphometric relationships in *Aphelenchus avenae*. Nematologica, 21:19-25.
- TREXLER, P.C. e L.I. REYNOLDS, 1957. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. Appl. Microbiol., 5:406-412.
- TYLER, J., 1933. Reproduction without males in aseptic root cultures of the root-knot nematode. Hilgardia, 7:373-388.
- VANFLETEREN, J.R., 1978. Axenic culture of free-living, plant-parasitic, and insect-parasitic nematodes. Ann. Rev. Phytopathol., 16:131-157.
- VIGLIERCHIO, D.R., 1971. Race genesis in *Ditylenchus dipsaci*. Nematologica, 17:386-392.

- VIGLIERCHIO, D.R. e N.A. CROLL, 1968. Host resistance reflected in differential nematode population structures. Science, 161:271-272.
- VIGLIERCHIO, D.R.; I.A. SIDDIQUI e N.A. CROLL, 1973. Culturing and population studies of *Ditylenchus dipsaci* under monoxenic conditions. Hilgardia, 42:177-214.
- WEBSTER, J.M., 1966. Production of oat callus and its susceptibility to a plant parasitic nematode. Nature, 212: 1472.
- WEBSTER, J.M., 1967. The influence of plant-growth substances and their inhibitors on the host-parasite relationships of *Aphelenchoides ritzemabosi* in culture. Nematologica, 13: 256-262.
- WEBSTER, J.M. e D. LOWE, 1966. The effect of the synthetic plant-growth substance, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, on the host-parasite relationships of plant-parasitic nematodes in monoxenic callus culture. Parasitology, 56:313-322.
- WONG, C.L. e H.J. WILLETTS, 1969. Gall formation in aerial parts of plants inoculated with *Meloidogyne javanica*. Nematologica, 15:425-428.

ZUCKERMAN, B.M., 1971. Gnotobiotic culture and its significance to plant nematology. Helminth. Abstr. 38:1-15.

ZUCKERMAN, B.M. e M.W. BRZESKI, 1965a. Study of plant parasitic nematodes in root culture in soil under sterile conditions. Nematologica, 11:46 (Abstr.).

ZUCKERMAN, B.M. e M.W. BRZESKI, 1965b. Methods for the study of plant parasitic nematodes in gnotobiotic root culture. Nematologica, 11:453-466.