

Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

Hercules Diniz Campos¹, Vicente Paulo Campos², Edson Ampélio Pozza²

¹Universidade de Rio Verde - FESURV, Faculdade de Agronomia, CP 104, CEP 75910-970, Rio Verde, GO, e-mail: campos@fesurv.br; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, CP 37, CEP 37200-000, Lavras, MG.

Autor para correspondência : Hercules Diniz Campos.

Data de chegada: 07/11/2005. Aceito para publicação em: 15/06/2007

1274

RESUMO

Campos, H.D.; Campos, V.P.; Pozza, E.A. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.29-33, 2008

Fatores abióticos influenciam a multiplicação celular, o desenvolvimento embrionário, bem como a sobrevivência e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. O efeito relativo à temperatura constante tem sido estudado com várias espécies e populações de *Meloidogyne*. Entretanto, tem sido pouco pesquisado a flutuação de temperatura, a qual predomina no campo entre o dia e a noite ou durante períodos de predominância de massas polares. Assim, objetivou-se estudar o efeito da flutuação de temperatura em ovos de *M. javanica* com estádios de desenvolvimento padronizados. Quando foram usados ovos com juvenis já formados, maior percentual de eclosão ocorreu em temperatura fixa de 28 °C, mas a redução do tempo de exposição a esta temperatura reduziu a eclosão. A exposição dos ovos por 10 horas a 10 °C, seguido de 14 horas a 28 °C, proporcionou maior eclosão dos J2 em relação ao mesmo período de exposição mas a 5 °C seguido de 14 horas a 28 °C. Já a incubação em

temperatura constante de 10 °C proporcionou menor taxa de eclosão. Ovos no estágio de duas células incubados em temperatura constante de 28 °C tiveram a multiplicação celular e o desenvolvimento embrionário acelerado em relação às alternadas. Em temperatura constante de 10 °C ocorreu apenas a multiplicação celular, após a incubação dos ovos por 12 dias. Entretanto, quando incubados por períodos de 10 horas a 10 °C seguido de 14 horas a 28 °C ocorreram a formação de juvenis e eclosão de J2, porém significativamente inferior às observadas em temperatura constante de 28 °C. Em temperaturas de 5 °C por 10 horas seguida de 28 °C por 14 horas, não proporcionou eclosão de juvenis no período de 12 dias. Nos ovos ocorreram apenas os estádios pluricelulares, gástrula e "tadpole". Portanto, a temperatura constante de 10 °C permite apenas a multiplicação celular, e o intervalo de temperatura entre 5 °C e 10 °C afeta drasticamente os processos envolvidos no desenvolvimento embrionário de *M. javanica*.

Palavras chave: Nematóide de galhas, ovos, eclosão, temperatura, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Campos, H.D.; Campos, V.P.; Pozza, E.A. Effect of temperature on embryonic development and in hatching of *Meloidogyne javanica*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.29-33, 2008

Abiotic factors affect the embryonic development, survival and hatching of second-stage juvenile (J2) of *Meloidogyne* spp. The effect of constant temperature has been studied with various species and populations of *Meloidogyne* spp. However, the temperature fluctuation which predominates in the field between day and night or during periods of predominance of polar cold front, has not been well studied. Thus, this work aimed to study the effect of temperature fluctuation on egg of *M. javanica* with standardized embryo development. When eggs with formed juveniles inside were used, highest percentage of hatching occurred at fixed temperature of 28 °C. The reduction of the exposure time at 28 °C reduced hatching. The eggs exposed for 10 hours at 10 °C and complemented by 14 hours at 28 °C resulted in greater J2 hatching as compared to 10 hours at 5 °C complemented by 14 hours at 28 °C. The incubation at fixed temperature

of 10 °C rendered lowest hatching. When eggs at the two-cell stage were used and incubated at 28 °C the cell multiplication and embryonic development were speeded up. At constant temperature of 10 °C for egg incubation during 12 days only cell multiplication occurred. However, when the incubation temperatures varied with period of 10 hours at 10 °C and complemented by 14 hours at 28 °C, juveniles were formed inside the eggs and hatched but significantly lower than those at constant temperature of 28 °C. At alternated temperatures of 10 hours at 5 °C, complemented by 14 hours at 28 °C, with the same incubation time, juveniles were not formed. In the eggs occurred only the pluricellular, gastrula and tadpole stages occurred. Therefore, the constant temperature of 10 °C allows only the cellular multiplication, and the temperature interval of 5 °C and 10 °C affect drastically several processes involved in embryo development of *M. javanica*.

Additional keywords: Root-knot nematode, eggs, hatching, temperature, embryonic development.

A sobrevivência de fitonematóides em condições ambientais adversas pode variar entre as espécies e entre os seus estádios de desenvolvimento. No ovo, ocorrem a multiplicação celular, formação e organização dos tecidos, desenvolvimento embrionário passando pelos períodos de mórula, blástula e gástrula, formando o juvenil

do primeiro estágio que após a primeira ecdise passa a juvenil do segundo estágio (J2) (4). Ainda dentro do ovo, vários fatores abióticos podem influenciar nesse desenvolvimento, bem como a sobrevivência e a eclosão de J2 de espécies de *Meloidogyne* (2, 12, 17).

Nas condições de campo, a temperatura é um fator extremamente importante para o sucesso do desenvolvimento e a manutenção da população do nematóide dentro ou fora da planta (7). O fator temperatura pode controlar o desenvolvimento embrionário dentro dos ovos e a habilidade do J2 em romper e liberar a casca do ovo (12). Entretanto, em pesquisas já realizadas, além de utilizar populações de ovos com vários estádios de desenvolvimento, avaliaram o efeito de temperaturas fixas ou em intervalos sem a determinação do tempo de exposição na embriogênese e na eclosão de J2 de *Meloidogyne*. Assim, Decker (5) e Wallace (17) verificaram que o intervalo de temperatura entre 15 e 30 °C possibilita o desenvolvimento da maioria das espécies de *Meloidogyne*. Já foi verificado também um efeito específico entre espécies quanto à temperatura. Vrain & Barker (16), observaram que ovos de *M. hapla* desenvolveram embriões a 8 °C, o que não aconteceu com *M. incognita*. A taxa de embriogênese em *M. javanica* sob temperatura de 15 °C foi aproximadamente 4 a 5 vezes menor do que aquela em 30 °C (2). Para *M. javanica*, a eclosão de J2 ocorreu mais rapidamente a 25 °C (2, 15). No entanto, a taxa de eclosão de J2 foi insignificante abaixo de 12 °C e 15 °C para *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente (3, 9). Aproximadamente 85% dos ovos de *M. javanica* submetidos à temperatura de 8 °C por 30 dias tiveram retardamento da eclosão dos J2, quando comparado àqueles não submetidos a esta temperatura (10). Já *M. chitwoodi* e *M. hapla* apresentaram taxas de eclosão satisfatórias mesmo em temperaturas próximas de 10 °C (13).

No entanto, pouco se conhece sobre o efeito de regimes de temperaturas flutuantes na eclosão de J2 e no desenvolvimento embrionário. Neste trabalho, objetivou-se avaliar: o percentual de eclosão de J2 de *M. javanica* a partir da incubação de ovos contendo juvenis e o progresso de desenvolvimento embrionário após a incubação de ovos no estágio de duas células.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de duas células ou contendo juvenis.

Raízes com galhas de plantas jovens de soja, cultivar Embrapa 20, aos 22 dias após inoculação e galhas de plantas velhas, aos 85 dias após inoculação, foram coletadas, separadamente, e os ovos foram extraídos conforme a técnica de Hussey & Barker (11). As impurezas misturadas aos ovos foram eliminadas vertendo-se a suspensão em peneira de 0,025mm e os ovos foram recolhidos com solução de sacarose (454g de açúcar por litro de água), centrifugada a 1700 rpm por 1 minuto. Em seguida, verteu-se o sobrenadante contendo os ovos em peneira de 0,025 mm, enxaguando-os em água corrente. A suspensão de ovos foi submetida a desinfestação superficial em solução de pentabíotico 300 ppm por 4 minutos. A seguir foi vertida, novamente, em peneira de 0,025 mm, e os ovos foram enxaguados com água de torneira autoclavada.

As suspensões de ovos desinfestados foram colocadas em placas de vidro e levadas para microscópio de objetiva invertida. Da suspensão obtida de raízes de plantas jovens foram separados apenas ovos no estágio de duas células e da obtida de galhas de plantas velhas foram separados ovos contendo juvenis.

Efeito de temperatura fixa e variada na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Vinte ovos contendo juvenis, constituindo a unidade experimental,

foram transferidos para cada célula da placa de Elisa. Essas placas foram acondicionadas em caixas plásticas (gerbox) e transferidas para câmaras com temperatura fixas de 10 ou 28 °C e temperaturas variadas: incubação por 10 horas a 5 °C seguida de 14 horas a 28 °C ou a 10 °C seguida de 28 °C, expostos pelos mesmos períodos de horas. Nessas condições os ovos com juvenis já formados foram incubados por 11 dias. A cada 24 horas quantificou-se, o número de J2 eclodidos. Obteve-se, no final, o percentual de J2 eclodidos nos 11 dias de incubação em cada tratamento térmico.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos térmicos e 11 períodos de incubação em seis repetições.

Para a análise de variância, assim como a de regressão, utilizou-se o programa SAS version 8 (SAS Institute Inc., Cary, USA). As fontes de variação significativas pelo teste F foram empregadas para construir os modelos de regressão. Em seguida, foram plotadas as curvas.

Efeito de temperatura fixa e variada na multiplicação celular e no desenvolvimento embrionário de *Meloidogyne javanica*.

Vinte ovos no estágio de duas células, constituindo a unidade experimental, foram transferidos para cada célula de placa de Elisa. Essas placas foram acondicionadas em caixas plásticas (Gerbox) e incubadas sob os mesmos regimes de temperatura descritos no ensaio anterior. Nessas condições, os ovos com duas células foram incubados por um período de 12 dias. A cada três dias, quantificou-se, o percentual de ovos que se encontrava em diferentes estádios, tais como: de duas e quatro células, pluricelular, gástrula, tadpole, com juvenil formado e J2 eclodidos. Ao final, obteve-se o percentual de cada estágio nos 12 dias de incubação em cada tratamento térmico.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos térmicos e quatro períodos de incubação, em 4 repetições.

Os dados obtidos foram transformados em raiz de $x + 0,5$ para a realização da análise de variância. Utilizou-se o programa Sisvar para realização da análise de variância e as médias foram comparadas através do teste de Scott & Knott (14) a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de temperatura fixa e variada na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

A eclosão de J2 de *M. javanica*, foi maior em temperatura constante de 28 °C e menor em 10 °C (Figura 1). Quando a temperatura foi alternada, a exposição a 10 °C propiciou melhor eclosão do que a 5 °C (Figura 1). A eclosão tanto em temperatura fixa como alternada aumentou com o tempo de incubação dentro do período estudado (Figura 1).

Como os ovos empregados neste ensaio já continham o juvenil formado, a maior eclosão a 28 °C pode indicar que esta temperatura é mais adequada ao processo de saída do J2 propiciando maior movimentação dentro do ovo do que a de 10 °C. Além disto, a redução do tempo de exposição à temperatura de 28 °C reduz a eclosão. Portanto, a redução da temperatura durante a noite leva a uma diminuição na eclosão. Freire & Ferraz (8) também encontraram maior eclosão de J2 de *M. incognita* e de *M. javanica* em temperatura de 28 °C, embora Bird (2) e Vrain (15) tenham observado que a eclosão de J2 de *M. javanica* foi mais rápida em temperaturas constantes de 25 °C e de 30 °C. Porém, a taxa de eclosão de J2 foi insignificante abaixo de 12 e 15 °C para *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente (3, 6, 9). A 8 °C, 85% dos ovos de *M. javanica* tiveram a eclosão inibida, quando comparados àqueles não submetidos a baixa temperatura (10).

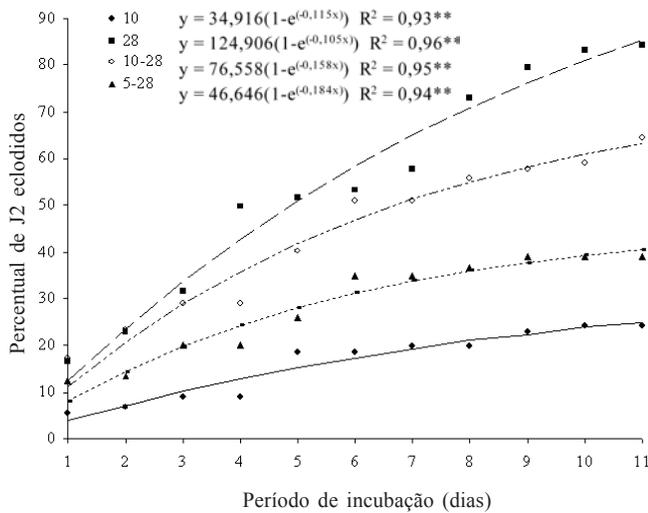


Figura 1. Efeito de temperaturas fixas de 28°C ou 10°C e variadas com 14 horas de 28°C e 10 horas de 10°C ou 10 horas a 5°C, no percentual de eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* a partir de ovos contendo juvenis já formados internamente e incubados por diferentes períodos de tempo em dias.

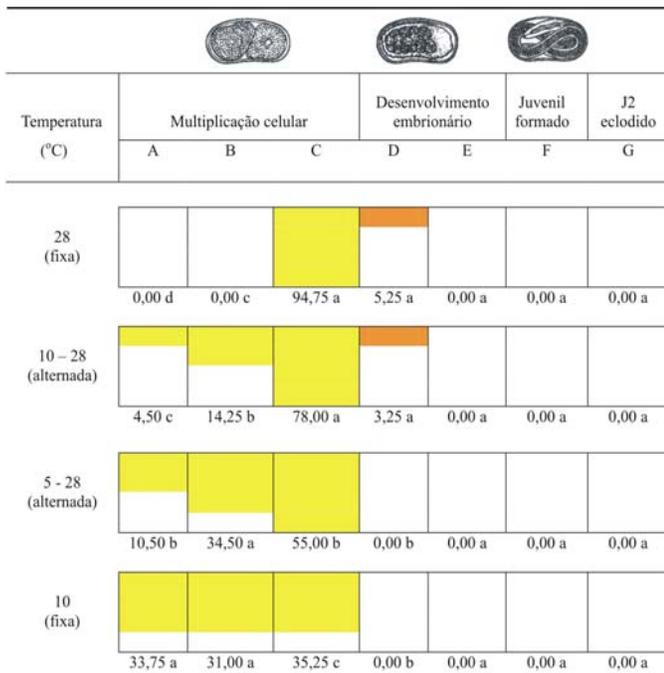


Figura 2. Porcentagem de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário, formação e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) a partir de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de 2 células incubados por 3 dias em temperaturas fixas (28°C ou 10°C) e alternadas (10°C e 28°C ou 5°C e 28°C). Fase de multiplicação celular (A = 2 células; B = 4 células; C = Pluricelular); Desenvolvimento embrionário (D = Gástrula; E = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionário (F = Juvenil dentro do ovo; G = J2 eclodido) e a porcentagem de cada um deles. Médias nas colunas entre temperaturas dentro do mesmo estágio, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5% de probabilidade.

Entretanto, como esses pesquisadores não usaram população homogênea de ovos com o juvenil já formado, esses efeitos podem ter ocorrido em fases anteriores à formação do juvenil, como multiplicação celular e desenvolvimento embrionário.

Efeito de temperatura fixa e variada na multiplicação celular e no desenvolvimento embrionário de *Meloidogyne javanica*.

Ovos no estágio de duas células incubados em temperatura fixa de 28°C, aos três dias, já apresentavam 94,75% no estágio pluricelular e 5,25% no estágio de gástrula. Contudo, diminuindo o tempo de exposição a 28°C, isto é alternando a temperatura, ocorreu um retardamento desse processo de multiplicação celular e do início do desenvolvimento embrionário. A exposição dos ovos em temperatura alternada por 10 horas a 10°C retardou menos o desenvolvimento em relação a exposição pelo mesmo período a 5°C. Na temperatura fixa de 10°C observou-se aproximadamente 1/3 dos ovos em cada estágio, de duas células, quatro células e pluricelular. Nesta temperatura de incubação ocorreram a maior (P<0,05) porcentagem de ovos ainda no estágio de duas células e a menor (P<0,05) no estágio pluricelular, caracterizando-a como a temperatura que tornou mais lento o processo de multiplicação celular e desenvolvimento embrionário dos regimes de temperatura testados neste período de incubação (Figura 2).

Aos seis dias de incubação dos ovos em temperatura fixa de 28°C, 83,75% já apresentavam juvenil formado no seu interior, o que não aconteceu quando alternou com temperatura de 10°C por 10 horas, o que causou um retardamento no desenvolvimento embrionário, entretanto, 42% avançaram até o estágio de gástrula e 13% ao de “tadpole”. Quando alternou, pelo mesmo período, com temperatura

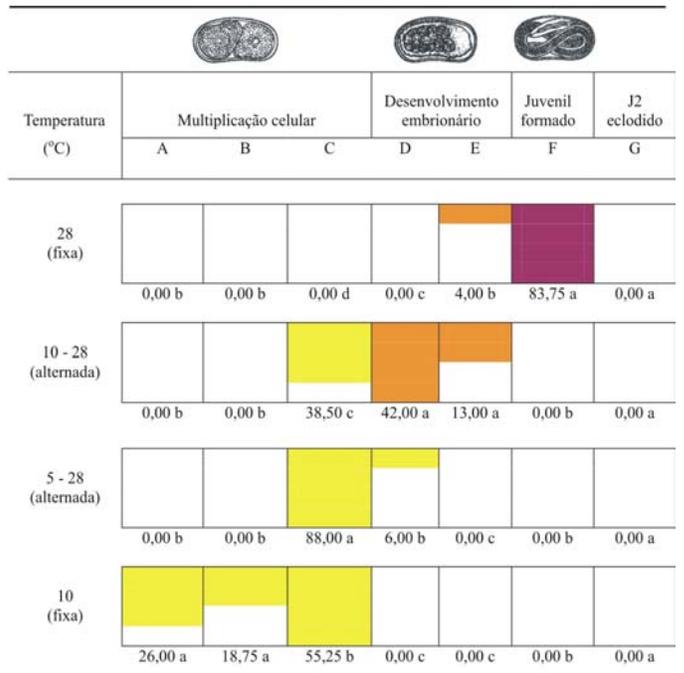


Figura 3. Porcentagem de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário, formação e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) a partir de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de 2 células incubados por 6 dias em temperaturas fixas (28°C ou 10°C) e alternadas (10°C e 28°C ou 5°C e 28°C). Fase de multiplicação celular (A = 2 células; B = 4 células; C = Pluricelular); Desenvolvimento embrionário (D = Gástrula; E = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionário (F = Juvenil dentro do ovo; G = J2 eclodido) e a porcentagem de cada um deles. Médias nas colunas entre temperaturas dentro do mesmo estágio, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5% de probabilidade.

de 5 °C, os ovos apenas alcançaram o estágio pluricelular. Na temperatura fixa de 10 °C maior quantidade de ovos chegou ao estágio pluricelular, porém não avançaram para os estádios embrionários (Figura 3).

Aos nove dias de incubação dos ovos em temperatura fixa de 28 °C, 34% dos juvenis eclodiram. Quando se alternou com 10 horas a 10 °C apenas 8,25% eclodiram, mantendo-se maior porcentual de ovos com juvenil formando, entretanto, ovos se distribuíram nas categorias: pluricelular, gástrula e “tadpole”. Contudo a alternância com temperatura de 5 °C por 10 horas não ocorreu formação do juvenil, com os ovos apresentando-se nos estádios pluricelulares, gástrula e “tadpole”. Na temperatura fixa de 10 °C concentrou-se maior número de ovos no estágio pluricelular e nenhum avançou para o estágio embrionário (Figura 4).

Aos 12 dias de incubação dos ovos a temperatura fixa de 28 °C não ocorreu alteração significativa na porcentagem de juvenis eclodidos em relação ao período de 9 dias. Quando se alternou com a temperatura de 10 °C por 10 horas, as porcentagens de ovos nas categorias mais avançadas do desenvolvimento embrionário aumentaram em relação aos 9 dias de incubação (Figuras 4 e 5). Contudo, a alternância com temperatura de 5 °C por 10 horas ocorreu 17,5% dos ovos com juvenis formando e os demais se distribuíram nas categorias: pluricelular, gástrula e “tadpole”. Na temperatura fixa de 10 °C não ocorreu nenhuma alteração com a incubação por 12 dias em relação ao período anterior (Figuras 4 e 5).

No período de incubação estudado de 12 dias a eclosão de J2 ocorreu, apenas, quando se incubaram os ovos em temperatura fixa de

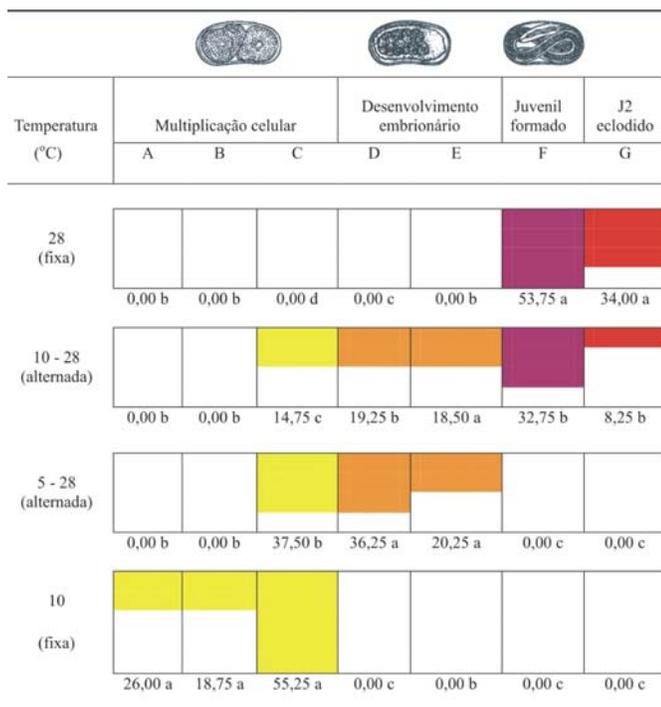


Figura 4. Porcentagem de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário, formação e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) a partir de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de 2 células incubados por 9 dias em temperaturas fixas (28 °C ou 10 °C) e alternadas (10 °C e 28 °C ou 5 °C e 28 °C). Fase de multiplicação celular (A = 2 células; B = 4 células; C = Pluricelular); Desenvolvimento embrionário (D = Gástrula; E = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionário (F = Juvenil dentro do ovo; G = J2 eclodido) e a porcentagem de cada um deles. Médias nas colunas entre temperaturas dentro do mesmo estágio, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

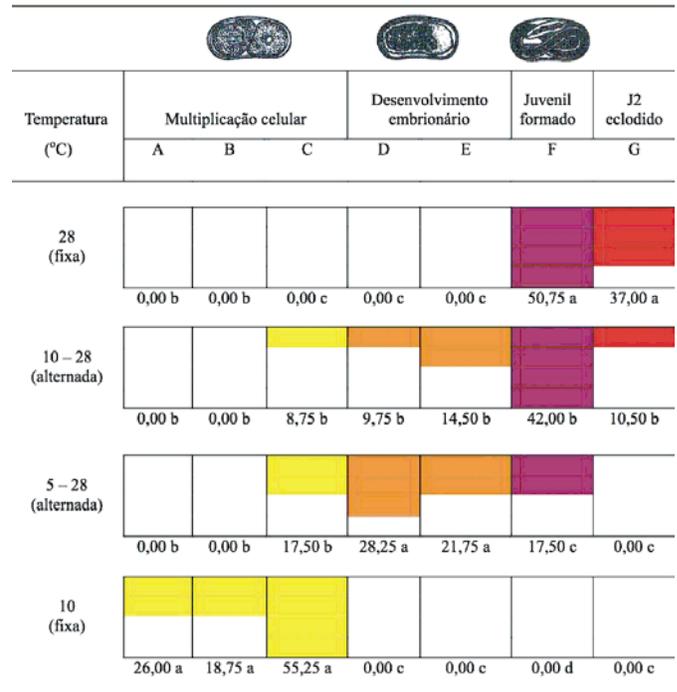


Figura 5. Porcentagem de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário, formação e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) a partir de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de 2 células incubados por 12 dias em temperaturas fixas (28 °C ou 10 °C) e alternadas (10 °C e 28 °C ou 5 °C e 28 °C). Fase de multiplicação celular (A = 2 células; B = 4 células; C = Pluricelular); Desenvolvimento embrionário (D = Gástrula; E = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionário (F = Juvenil dentro do ovo; G = J2 eclodido) e a porcentagem de cada um deles. Médias nas colunas entre temperaturas dentro do mesmo estágio, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

28 °C e quando se alternou com 10 horas a 10 °C, porém em proporção significativamente superior em temperatura fixa de 28 °C (Figura 5). Portanto, a maior ($P \leq 0,05$) eclosão em temperatura fixa de 28 °C (Figura 5) pode indicar que esta temperatura acelera a embriogênese de *M. javanica*. Bird (2) encontrou taxa de embriogênese de *M. javanica* sob temperatura constante de 30 °C cerca de 4 a 5 vezes superior àquela a 15 °C. Vrain & Barker (16) consideraram as temperaturas entre 25 e 30 °C como ótimas para a embriogênese de *M. incognita*.

A não ocorrência de nenhum ovo, nos estádios de desenvolvimento embrionário estudados (gástrula e “tadpole”) durante os 12 dias de incubação em temperatura fixa de 10 °C indica que esta temperatura propicia apenas a multiplicação celular de forma lenta, sem propiciar condições para a organização de tecidos. Como ocorreu evolução no número de células ao longo do período de incubação do ovo, a temperatura de 10 °C não causa injúria e morte nas células. Vrain & Barker (16) incubando ovos de *M. incognita* em temperatura constante de 8 °C não observaram desenvolvimento de embriões. Bergeson (1) observou redução de 75% na sobrevivência de embriões dentro de ovos de *M. incognita*, quando ovos foram incubados em temperaturas inferiores a 10 °C. Entretanto, Bergeson (1) trabalhou com população de ovos contendo diversos estádios de desenvolvimento dos embriões, tornando assim, difícil especificar o efeito da temperatura em cada estágio de desenvolvimento do embrião. Ao contrário, Bird (2) trabalhou em suas pesquisas com ovos apenas no estágio de duas células e observou uma taxa extremamente baixa em ovos incubados a 15 °C, embora tenha sido a temperatura estudada em seu trabalho.

A alternância de temperatura de incubação dos ovos com exposição de 10 horas, a 10 °C ou 5 °C, retarda o processo de desenvolvimento embrionário em relação a temperatura constante de 28 °C. Entretanto, a exposição à 5 °C proporcionou maior ($P \leq 0,05$) redução do desenvolvimento embrionário do que a alternância com 10 horas a 10 °C (Figuras 2,3, 4 e 5). Provavelmente o intervalo de temperatura entre 10 °C e 5 °C afetou de forma drástica a fisiologia do processo embrionário. De fato, com relação a exposição dos ovos a 10 °C, os resultados aqui obtidos (Figuras 2, 3, 4 e 5) demonstraram a necessidade de alguma exposição a temperaturas superiores a esta para disparar o processo embrionário. Portanto, em pesquisas futuras, sugere-se ênfase no desenvolvimento embrionário em temperaturas alternadas e utilização de população homogênea de ovos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergeson, G.B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne* in the absence of a host. **Nematologica**, Leiden, v.4, p. 344-354, 1959.
2. Bird, A.F. Influence of temperature on embryogenesis in *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Raleigh, v.4, p. 206-213, 1972.
3. Bird, A.F.; Wallace, H.R. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, Leiden, v.11, p. 581-589, 1965.
4. Campos, V.P.; Campos, J.R.; Silva, L.H.C.P.; Dutra, M.R. Manejo de nematóides em hortaliças. In: Silva, L.H.C.P.; Campos, J.R.; Nojosa, G.B.A. **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p.125-158.
5. Decker, H. **Plant nematodes and their control (Phytonematology)**. New York: Brill, 1989. 540p.
6. Dutra, M.R. **Manejo do solo e da água no controle de nematóides de galhas (*Meloidogyne* sp.) e estudos "in vitro" da temperatura e umidade na infectividade desses patógenos**. 2002. 131p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.
7. Evans, A.A.F. Diapause in nematodes as a survival strategy. In: Veech, J.A.; Dickson, D.W. **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p.180-187.
8. Freire, F.C.O.; Ferraz, S. Resistência de cultivares de feijoeiro a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e influência da temperatura e exsudatos radiculares sobre a eclosão de seus juvenis. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 24, n. 133, p. 247-260, 1977.
9. Goodell, P.B.; Ferris, H. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.21, n.3, p.328-334, 1989.
10. Huang, S.P.; Pereira, A.C. Influence of inoculum density, host, and low-temperature period on delayed hatch of *Meloidogyne javanica* eggs. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.26, n.1, p.72-75, 1994.
11. Hussey, R.S.; Barker, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1128, 1973.
12. Lee, D.L. Atkinson, H.J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University, 1977. 215p.
13. Santo, G.S.; O'Bannon, J.H. Effect of soil temperature on the pathogenicity and reproduction of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* on Russet Burbank potato. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.13, p. 483-486, 1981.
14. Scott, A.J.; Knott, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.
15. Vrain, T.C. Influence of chilling and freezing temperatures on infectivity *Meloidogyne incognita* and *M. hapla*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.10, n.2, p.177-180, 1978.
16. Vrain, T.C.; Barker, K.R. Influence of low temperature on development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* eggs in egg masses. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.10, n.4, p.311-313, 1978.
17. Wallace, H.R. The influence of temperature on embryonic development and hatch of *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, Leiden, v. 171, p. 170-186, 1971.