

# EFICIÊNCIA RELATIVA DA TÉCNICA DE FLUTUAÇÃO CENTRÍFUGA, USANDO-SE DIFERENTES LÍQUIDOS DE SEPARAÇÃO, VELOCIDADES DE CENTRIFUGAÇÃO E CAULIM, PARA EXTRAIR FITONEMATÓIDES DE TRÊS TIPOS DE SOLO<sup>1/</sup>

Maria de Lourdes Mendes <sup>2/</sup>  
Silamar Ferraz <sup>2/</sup>  
Adair José Regazzi <sup>3/</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

A extração de nematóides do solo pelo método de flutuação centrífuga é comum na fitonematologia. Algumas características, como rapidez, facilidade de execução, viabilidade dos espécimes extraídos, eficiência na recuperação, particularmente de *Criconematidae*, e suspensão final livre de detritos indesejáveis, constituem algumas das vantagens desse método (4, 7, 16). Ademais, a dependência da densidade torna a técnica menos sujeita a erros por parte do operador (15). Usada inicialmente na parasitologia animal, foi ela adaptada à fitonematologia por CAVENESS e JENSEN (9) e, depois, melhorada por JENKINS (16), tornando-se um dos métodos mais usados para extrair nematóides em todo o mundo.

Os diferentes fatores que influem na recuperação de nematóides do solo pela

---

<sup>1/</sup> Parte de tese de mestrado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa.

Aceito para publicação em 25-8-1987.

<sup>2/</sup> Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. 36570 Viçosa, MG.

<sup>3/</sup> Departamento de Matemática da Universidade Federal de Viçosa. 36570 Viçosa, MG.

flutuação centrífuga têm sido objeto de numerosos estudos. Diversas combinações de velocidade e tempo de centrifugação (5, 6, 7, 8, 16, 22, 25), diversos líquidos de separação — soluções de açúcar, melaço de cana-de-açúcar, sulfato de zinco e de magnésio, sílica coloidal, etc. — e suas densidades têm sido testados para vários gêneros de fitonematóides (7, 8, 12, 18, 19, 21). Outros aspectos que têm merecido a atenção dos pesquisadores são a textura do solo (20, 23, 24, 26, 27), o volume e número de lavagens das amostras, o tempo de repouso da suspensão de solo antes do peneiramento (2, 3) e o peneiramento do solo antes do processamento (13).

O uso de caulim tem sido sugerido por alguns pesquisadores para aumentar a recuperação de larvas e ovos de *Meloidogyne* spp. e outros nematóides de raízes e solo (10, 11, 14).

Visando a contribuir para o aprimoramento da técnica de flutuação centrífuga, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da velocidade de centrifugação, do líquido de separação e da aplicação de caulim na extração de diferentes gêneros de fitonematóides de solo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados solos de três classes texturais: franco-arenoso, muito argiloso e argilo-arenoso. A origem desses solos e o seu manuseio, bem como o resultado das análises química e granulométrica, foram descritos em trabalho anterior (17). As amostras, divididas em subamostras de 50 g, também foram infestadas com 500 espécimes de *Helicotylenchus* sp. e *Nothocriconema* sp. e 250 larvas (L 2) de *Meloidogyne* sp., como descrito no referido trabalho. Após a infestação, as amostras foram armazenadas em câmara com temperatura regulada para  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , por período de 24 a 48 h, e processadas pela técnica de flutuação centrífuga de JENKINS (16) e de COOLEN e D'HERDE (11). Cada subamostra de solo foi colocada em balde plástico de cinco litros de capacidade. Adicionaram-se cerca de dois litros de água, misturando-se completamente. Após 20 segundos de repouso, a suspensão foi vertida através de peneiras de 20 e 325 mesh, e os resíduos e nematóides retidos na peneira de 325 mesh coletados em tubos de centrifuga de 50 ml. Foi testado o efeito da presença e ausência de caulim na eficiência do método. No tratamento com caulim, misturaram-se 2,0 ml (1,5g) do pó ao conteúdo de cada tubo, com bastão de vidro. Procedeu-se a dois ciclos de centrifugação em centrifuga FANEM (centrifuga de mesa com oito tubos de 50 ml). A primeira centrifugação foi a 1750 rpm (cerca de 450 g) ou 2600 rpm (cerca de 980 g) durante 5 min, após os quais se descartou o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com o líquido-teste. Como líquidos-testes foram empregadas soluções de açúcar (454g/litro de água), sulfato de zinco (272g/litro de água) e sulfato de magnésio (364g/litro de água), todos com densidade de 1,13. Após a ressuspensão, centrifugou-se novamente, por 1 min, nas mesmas velocidades. O conteúdo de cada tubo foi vertido em peneira de 325 mesh, e os nematóides recolhidos em béquer (Figura 1). Em seguida, realizou-se a avaliação em placa de contagem comum, em microscópio estereoscópico.

Para cada gênero, foram realizados três experimentos, um para cada textura de solo, montados no delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial  $3 \times 2 \times 2$ , com seis repetições. Os fatores estudados foram três líquidos de separação, duas velocidades de centrifugação e dois tratamentos com caulim (presença e ausência).

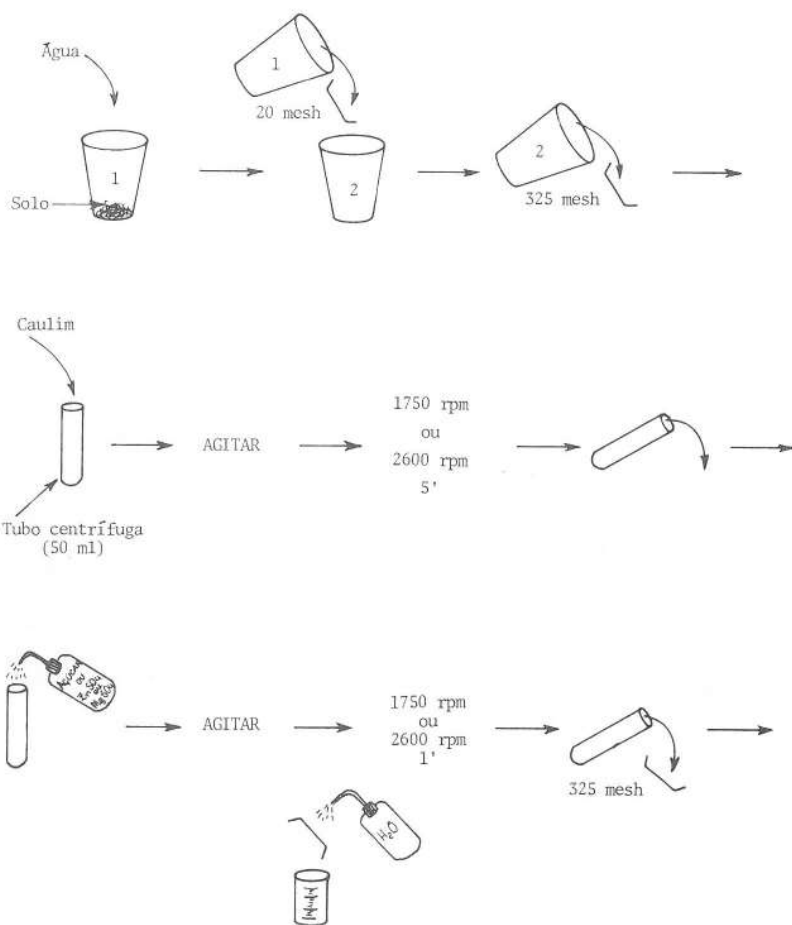


FIGURA 1 - Flutuação centrífuga, com o uso de caulim e diferentes líquidos de separação (Adaptado de COOLEN e D'HERDE, 1972, e JENKINS, 1964).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística mostrou que, com relação aos nematóides dos gêneros *Helicotylenchus* e *Nothocriconema*, não houve diferença significativa das interações, de segundo e terceiro grau, de líquidos de separação, velocidades de centrifugação e caulim. Quanto a *Meloidogyne* sp., detectou-se interação significativa de líquidos de separação e velocidades de centrifugação nos solos franco-arenoso e muito argiloso. Com relação aos fatores isolados, detectou-se efeito significativo apenas do caulim, para os três gêneros selecionados, em algumas texturas.

O efeito do caulim na recuperação de nematóides dos gêneros *Helicotylenchus*, *Nothocriconema* e *Meloidogyne* (larvas) dos solos franco-arenoso, muito argiloso e argilo-arenoso é apresentado nos Quadros 1, 2 e 3. A adição de caulim à suspensão de solo antes da centrifugação é sugerida por Kermarrec e Berge (1972), citados por HARRISON e GREEN (15), para reduzir as perdas de larvas e nematóides pequenos, que permanecem em suspensão e são descartados com o sobrenadante. As partículas de caulim, por serem pequenas e lisas, sedimentam-se mais lentamente que os nematóides, apesar de terem gravidade específica 2,6 vezes maior, o que resulta em película firme sobre o sedimento, selando-o durante a decantação. A camada de caulim é completamente desintegrada ao se proceder à ressuspensão e precipita durante a segunda centrifugação, evitando a reintegração dos resíduos no momento da decantação e permitindo a obtenção de uma suspensão livre de resíduos orgânicos (10).

A influência do caulim na recuperação de cada gênero de nematóide foi analisada, separadamente, em cada textura de solo. Para o gênero *Helicotylenchus*, verificou-se que o caulim reduziu, significativamente, a recuperação de nematóides do solo franco-arenoso (Quadro 1). Resultado semelhante foi obtido com o gênero *Nothocriconema* nos solos franco-arenoso e muito argiloso (Quadro 2). Quanto aos solos muito argiloso e argilo-arenoso para *Helicotylenchus* sp. e argilo-arenoso para *Nothocriconema* sp., apesar da não-significância dos tratamentos com e sem caulim, pode-se observar que menor recuperação foi obtida sempre na presença do caulim (Quadros 1 e 2). No que diz respeito à recuperação de larvas de

QUADRO 1 - Influência do uso de caulim na extração de *Helicotylenchus* sp. de solos de diferentes texturas, pela técnica de flutuação centrífuga. UFV. Viçosa, MG. 1986<sup>1/</sup>

Tratamentos	Número médio de nematóides extraídos		
	Franco-arenoso	Muito argiloso	Argilo-arenoso
Com caulim	140,47 A	105,56 A	182,98 A
Sem caulim	172,20 B	111,97 A	188,58 A

<sup>1/</sup> Os dados são médias de seis repetições. População inicial: 500 + 10 espécimes. Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

QUADRO 2 - Influência do uso de caulim na extração de *Nothocriconema* sp. de solos de diferentes texturas, pela técnica de flutuação centrífuga. UFV, Viçosa, MG, 1986<sup>1/</sup>

Tratamentos	Número médio de nematóides extraídos		
	Franco-arenoso	Muito argiloso	Argilo-arenoso
Com caulim	157,81 A	108,42 A	145,20 A
Sem caulim	227,14 B	186,50 B	165,70 A

<sup>1/</sup> Os dados são médias de seis repetições. População inicial: 500 + 10 espécimes. Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

*Meloidogyne* sp. (Quadro 3), a adição de caulim resultou em extração máxima nos três tipos de solo. O efeito do caulim, sem considerar a textura do solo, é apresentado na Figura 2, para os três gêneros de fitonematóides. COOLEN (10) relatou o uso de caulim para obter uma suspensão final clara, livre de resíduos orgânicos, fato comprovado no presente trabalho.

A interação de líquidos de separação e velocidades de centrifugação proporcionou diferença significativa apenas na recuperação de larvas de *Meloidogyne* sp. de solos franco-arenoso e muito argiloso. No solo franco-arenoso (Quadro 4), a velocidade de 1750 rpm proporcionou recuperação de larvas significativamente maior quando foram empregadas soluções de sulfato de zinco ou sulfato de magnésio. Já no solo muito argiloso (Quadro 5), a maior recuperação foi observada com a menor velocidade (1750 rpm), utilizando-se solução de sulfato de zinco ou de açúcar. Quando foi utilizada solução de sulfato de magnésio, maior percentagem foi recuperada com a velocidade de 2600 rpm. Os demais gêneros não foram afetados, significativamente, nem pela solução de separação, nem pela velocidade de centrifugação. Independentemente da textura do solo, verificou-se que, para o gênero *Helicotylenchus*, houve tendência de recuperação de maior percentagem de nematóides com a velocidade de 2600 rpm; foi observado o inverso para larvas de *Meloidogyne* sp., cuja recuperação foi maior com 1750 rpm, enquanto, para *Nothocriconema* sp., as quantidades extraídas com 1750 e 2600 rpm foram praticamente iguais (Figura 3). Com relação ao efeito do líquido de separação, também não foi detectada significância, embora, sem considerar a textura do solo, a solução de sulfato de zinco tenha apresentado tendência para proporcionar maior percentagem de recuperação de nematóides do gênero *Helicotylenchus*; já para os nematóides do gênero *Nothocriconema* as percentagens de recuperação com soluções de sulfato de zinco e de magnésio foram quase iguais, porém superiores à percentagem de recuperação com solução de açúcar, enquanto larvas de *Meloidogyne* sp. foram recuperadas em percentagens praticamente iguais com os três líquidos de separação (Figura 4).

Apesar de, em algumas combinações, soluções de sulfato de zinco ou de magnésio proporcionarem maior recuperação, seu uso deve ser limitado, princi-



QUADRO 3 - Influência do uso de caulim na extração de *Meloidogyne* spp. de solos de diferentes texturas, pela técnica de flutuação centrífuga. UFV, Viçosa, MG, 1986<sup>1/</sup>

Tratamentos	Número médio de nematóides extraídos		
	Franco-arenoso	Muito argiloso	Argilo-arenoso
Com caulim	74,28 A	56,78 A	64,48 A
Sem caulim	59,50 B	51,86 A	56,70 B

<sup>1/</sup> Os dados são média de seis repetições. População inicial: 250 ± 10 larvas. Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

QUADRO 4 - Efeito de diferentes líquidos de separação e velocidades de centrifugação na extração de larvas de *Meloidogyne* spp. de solo franco-arenoso, pela técnica de flutuação centrífuga, UFV, Viçosa, MG, 1986<sup>1/</sup>

Velocidades de Centrifugação	Número médio de nematóides extraídos		
	Solução de açúcar	Solução de ZnSO <sub>4</sub>	Solução de MgSO <sub>4</sub>
1750 rpm	75,17 Aa	71,25 Aa	81,83 Aa
2600 rpm	61,50 Aa	52,42 Ba	59,17 Ba

<sup>1/</sup> Os dados são médias de seis repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula, em cada coluna, e de mesma letra minúscula, em cada linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

palmente em extrações de nematóides para experimentos ou estudos taxonômicos, uma vez que sua ação sobre esses organismos não é bem conhecida. DE-CRAEMER *et alii* (12) relataram que os espécimes extraídos com solução de sulfato de magnésio são de má qualidade, não servindo para estudos morfológicos e taxonômicos: os órgãos internos são severamente afetados, seus contornos tor-

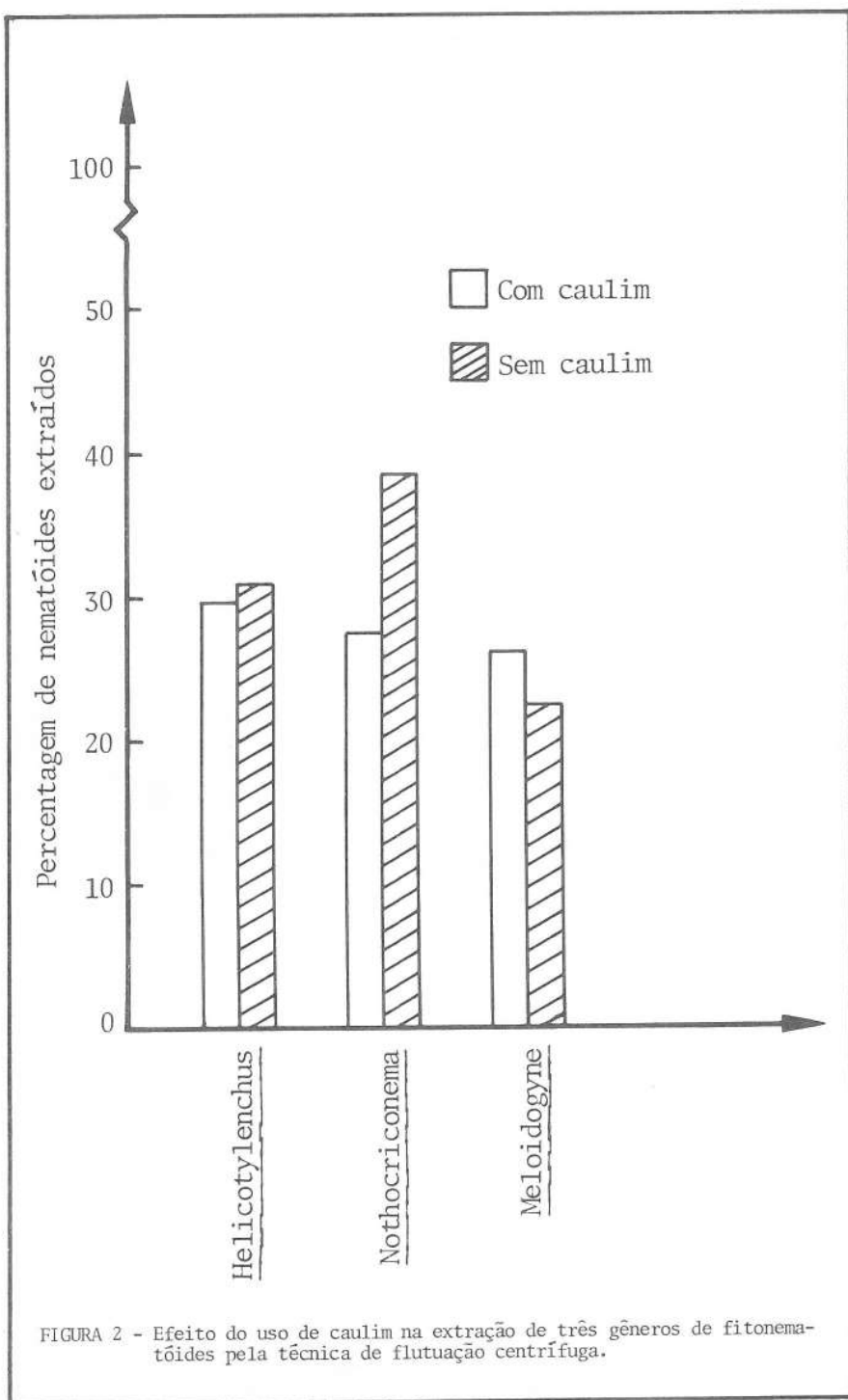


FIGURA 2 - Efeito do uso de caulim na extração de três gêneros de fitonematóides pela técnica de flutuação centrífuga.

QUADRO 5 - Efeito de diferentes líquidos de separação e velocidades de centrifugação na extração de larvas de *Meloidogyne* spp. de solo muito argiloso, pela técnica de flutuação centrífuga. UFV, Viçosa, MG, 1986<sup>1/</sup>

Velocidades de centrifugação	Número médio de nematóides extraídos		
	Solução de açúcar	Solução de ZnSO <sub>4</sub>	Solução de MgSO <sub>4</sub>
1750 rpm	52,75 Aab	64,00 Aa	48,75 Ab
2600 rpm	49,58 Aab	48,08 Ba	62,75 Bb

<sup>1/</sup> Os dados são médias de seis repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula, em cada coluna, e da mesma letra minúscula, em cada linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

nam-se indefinidos e o esôfago fica obscuro. A solução de açúcar deve ser preferida, por ser de fácil aquisição e de baixo custo, além de não alterar o potencial infectivo dos nematóides (15, 16).

Não há na literatura relatos que indiquem a velocidade de centrifugação ideal para a maioria dos gêneros de nematóides. BRAVO (7), empregando, com sucesso, a velocidade de 2800 rpm para extrair larvas de *Tylenchulus semipenetrans* e, em outro trabalho (8), 2600 rpm para extrair *Xiphinema mediterraneum*, sugeriu que a eficácia do método de flutuação centrífuga dependeria, principalmente, da espécie que se quisesse extrair. Isso foi comprovado, posteriormente, por VOLCY (22), que obteve maior número de *Helicotylenchus dihystera* com 1000 rpm e larvas de *M. incognita* com 2000 rpm. Já WEHUNT (25) obteve melhores resultados, com *Pratylenchus vulnus* e *Criconemoides xenoplax*, empregando a mesma velocidade sugerida por JENKINS (16), ou seja, 1750 rpm.

No presente trabalho, verificou-se que o aumento da velocidade de centrifugação de 1750 rpm para 2600 rpm reduziu, significativamente, a extração de larvas de *Meloidogyne* sp. de solos franco-arenoso e muito argiloso, enquanto, para *Helicotylenchus* sp. e *Nothocriconema* sp., a recuperação, nos três tipos de solo, com 1750 e 2600 rpm, não diferiu estatisticamente. Esses resultados são inversos aos obtidos por VOLCY (22) com *M. incognita* e *H. dihystera*, de solo de textura leve, nas mesmas velocidades.

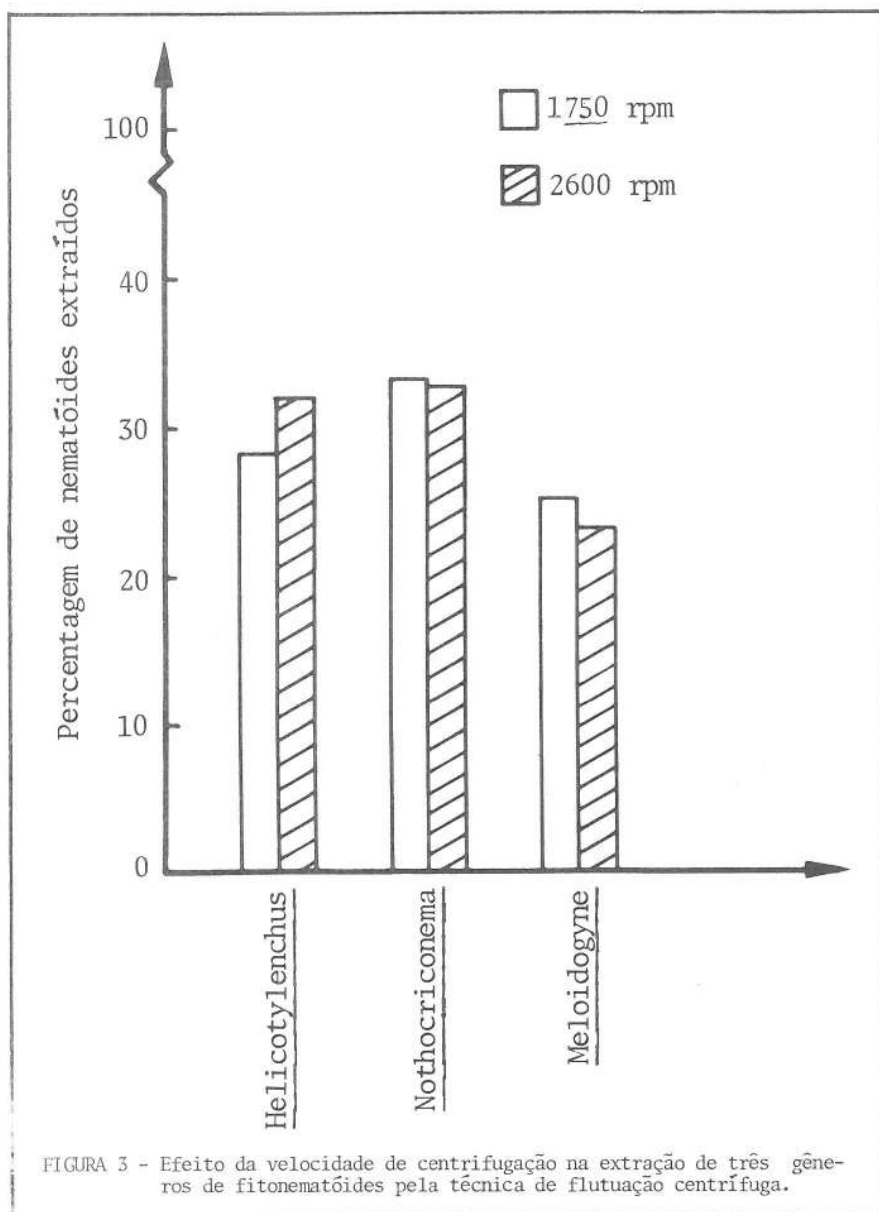
#### 4. RESUMO

Foram testadas algumas modificações da técnica de flutuação centrífuga, visando aumentar a sua eficiência na extração de nematóides parasitos de plantas de amostras de solo.

Foram usados nos testes três tipos de substrato: solo arenoso (SA), solo argiloso (SR) e mistura em partes iguais de ambos (SM), artificialmente infestados com *Helicotylenchus* sp., *Nothocriconema* sp. e larvas de *Meloidogyne* sp.

A adição de caulim à suspensão que seria centrifugada reduziu significativa-





mente a extração de *Helicotylenchus* sp. em SA e *Nothocriconema* sp. em SA e SR. Também ocorreu redução nos outros tipos de solo, embora não estatisticamente significativa. Por outro lado, o caulim aumentou a extração de larvas de segundo estágio de *Meloidogyne* sp., principalmente em SA e SM. Em todos os casos o uso do caulim propiciou uma suspensão de nematoides mais limpa no final.

A extração foi aproximadamente a mesma, para todos os nematoides, quando se usaram as velocidades de 1750 rpm (450 g) ou 2.600 rpm (980 g).

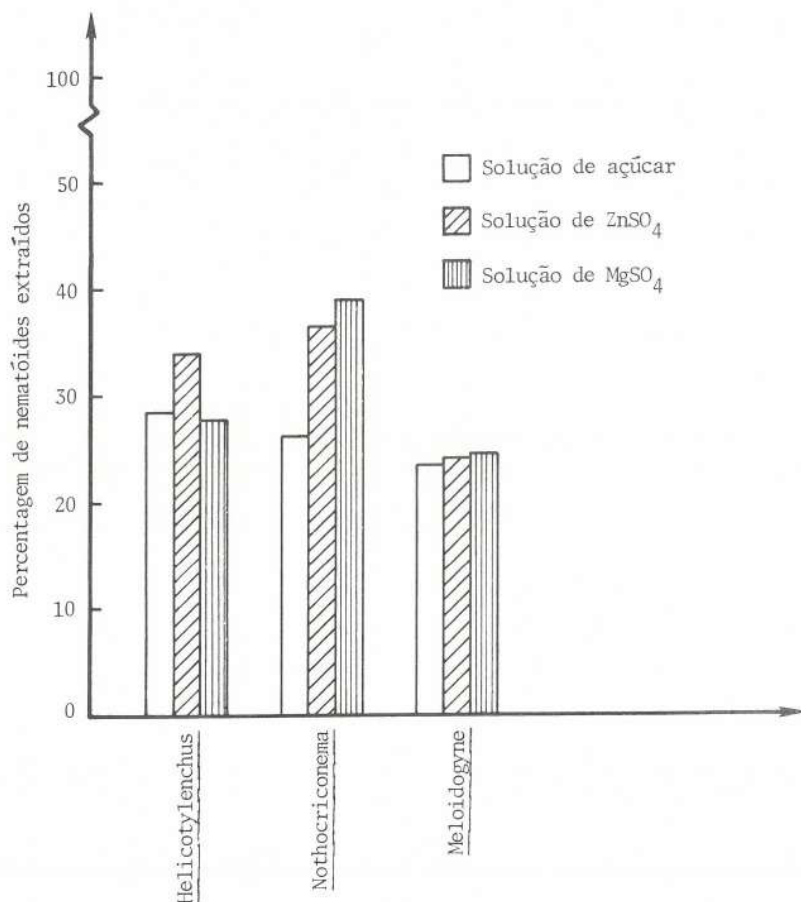


FIGURA 4 - Efeito de líquidos de separação na extração de três gêneros de fitonematóides pela técnica de flutuação centrífuga.

Soluções de sulfato de zinco e sulfato de magnésio, usadas na centrifugação, foram comparadas à solução de açúcar preconizada no método original, todos na mesma densidade relativa. Não houve grandes variações na eficiência da extração dos três nematóides nos três tipos de solo.

Conclui-se que, embora a eficiência de extração possa ser aumentada, para certos nematóides, em algum tipo de solo, através de modificações, a técnica original de flutuação centrífuga, usando-se solução de sacarose e velocidade de 1750

rpm, sem adicionar caulim, ainda é boa escolha para extrações em geral de nematóides do solo.

## 5. SUMMARY

(RELATIVE EFFICIENCY OF THE CENTRIFUGAL FLOTATION TECHNIQUE USING DIFFERENT LIQUIDS OF SEPARATION, CENTRIFUGE SPEED AND KAOLIN TO RECOVER PLANT PARASITIC NEMATODES FROM SOIL TYPES)

Several modifications were made in the centrifugal flotation technique in an attempt to increase efficiency in extracting plant parasitic nematodes from soil samples.

Three soil types were used in the tests: a sandy soil (SS), a clay soil (CS) and a mixture of equal parts (MS), and these were artificially infested with *Helicotylenchus* sp., *Nothocriconema* sp. and *Meloidogyne* sp. larvae.

Addition of kaolin significantly reduced the recovery of *Helicotylenchus* in SS and *Nothocriconema* in SS and CS. In the other soil types kaolin also reduced the efficiency of recovery although not significantly. On the other hand kaolin increased the recovery of *Meloidogyne* larvae (L2) mainly in SS and MS. In all cases use of kaolin gave clearer nematode suspensions at the end.

Recovery was about the same when centrifugal forces of 1750 rpm (450 g) or 2600 rpm (980 g) were used.

Solutions of zinc sulphate and magnesium sulphate were compared to sugar solution, all of them with the same density. Results showed no expressive differences on the degree of recovery for all three nematode species in the different soil types.

Although the efficiency of recovery may be increased for specific nematodes in certain soil types through modifications, the original method of centrifugal flotation with sugar solution at 1750 rpm without kaolin still is the first choice for general purpose extractions.

## 6. LITERATURA CITADA

1. ALLEN, O.N. *Experiments in soil bacteriology*. Minneapolis, Burgess, 1959, 117 p.
2. ALVARADO S., M. & LOPEZ C., R. Extracción de nemátodos fitoparásitos asociados al arroz, cv. C.R. 1113, mediante modificaciones de las técnicas de centrifugación-flotación y embudo de Baermann modificado. In: RESEARCH AND PLANNING CONFERENCE ON ROOT-KNOT NEMATODES, *Meloidogyne* spp., 3<sup>th</sup>, Panamá, 1982. Proceedings, Panamá City, IDIAP, 1982. p.35-47.
3. ALVARADO S., M. & LOPEZ C., R. Recuperación de larvas de *Meloidogyne incognita* de tres suelos tropicales por modificaciones de las técnicas del embudo de Baermann modificado y centrifugación-flotación. *Turrialba* 32(1): 83-87. 1982.
4. AYALA, A.; ROMÁN, J. & TARJAN, A.C. Comparison of four methods for isolating nematodes from soil samples. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 47(4):219-225. 1963.

5. BARKER, K.R. *Root-Knot Workshop — Extraction*. S.I., s. ed., 1983. 8 p.
6. BARKER, K.R.; NUSBAUM, C.J. & NELSON, L.A. Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic nematodes as measured by three extraction procedures. *Journal of Nematology* 1(3):232-239. 1969.
7. BRAVO, M.A.C. Eficácia do método de flutuação centrífuga na extração de nemátodos de pequenas dimensões. *Agronomia Lusitana* 34(4):283-291. 1972.
8. BRAVO, M.A.C. Comparison of the Christie and Perry and the centrifugal-flotation methods for extracting *Xiphinema mediterraneum* from soil. *Agronomia Lusitana* 38(3):203-212. 1977.
9. CAVENESS, F.E. & JENSEN, H.J. Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and eggs from soil and plant tissue. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 22(2):87-89. 1955.
10. COOLEN, W.A. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: LAMBERTI, F. & TAYLOR, C.E., ed. *Root-knot nematodes (Meloidogyne species); Systematics, Biology and Control*. London, Academic Press, Inc., 1979. p. 317-329.
11. COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. Extraction de *Longidorus* et *Xiphinema* spp. du sol par centrifugation en utilisant du silice colloidal. *Nematologia Mediterranea* 5(2):195-206. 1977.
12. DECRAEMER, W.; COOLEN, W.A. & HENDRICK, G.J. Evaluation of extraction methods for a survey of Trichodoridae in fields of the seed potatoes. *Nematologica* 25:494-495. 1975.
13. DICKERSON, O.J. An evaluation of the direct centrifugal-flotation method of recovering nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 61(12):1054-1057. 1977.
14. GOORIS, J. & D'HERDE, C.J. *A method for the quantitative extraction of eggs second stage juveniles of Meloidogyne spp. from soil*. Belgium, Min. Agric., State Nematol. Res. Station, 1972. 36 p.
15. HARRISON, J.M. & GREEN, C.D. Comparison of centrifugal and other methods for standardization of extraction of nematodes from soil. *Annual of Applied Biology* 82(2):299-308. 1976.
16. JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48(9):692. 1964.
17. MENDES, M.L.; FERRAZ, S. & REGAZZI, A.J. Eficiência de seis métodos de extração na recuperação de nematóides de diferentes géneros em três tipos de solo. *Revista Ceres* 35(197):1-16. 1988.
18. RODRIGUEZ-KABANA, R. & KING, P.S. Efficiency of extraction of nematodes by flotation-sieving using molasses and sugar and by elutriation. *Journal of Nematology* 7(1):54-59. 1975.

19. RODRIGUEZ-KABANA, R. & KING, P.S. The use of sugarcane molasses as an economical substitute for sugar in the extraction of nematodes from soil by the flotation-sieving technique. *Plant Disease Reporter* 56(12):1093-1096. 1972.
20. VIGLIERCHIO, D.R. & SCHMITT, R.V. On the methodology of nematode extraction from field samples: comparison of methods for soil extraction. *Journal of Nematology* 15(3):450-454. 1983.
21. VIGLIERCHIO, D.R. & YAMASHITA, T.T. On the methodology of nematode extraction from field samples: density flotation technique. *Journal of Nematology* 15(3):444-449. 1983.
22. VOLCY, C. Velocidad y tiempo de centrifugación para extraer nemátodos fitoparásitos del suelo. *Rev. Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 33(1): 15-20. 1980.
23. VOLCY, C. Evaluación de métodos de extracción de nemátodos en suelos de diferentes texturas. *Fitopatología Colombiana* 7(1):15-18. 1978.
24. WEBER, D.E. & WILLIAMS, A.S. Evaluation of the centrifugal-flotation technique for the quantitative recovery of three types of ectoparasitic nematodes. *Nematologica* 14(1):18. 1968.
25. WEHUNT, E.J. Sodium-containing detergents enhance the extraction of nematodes. *Journal of Nematology* 5(1):79-80. 1973.
26. WILLARD, J.R. & PETROVICH, M.S. Efficiency of the centrifugal-flotation method for extraction of nematodes from clay soils. *Plant Disease Reporter* 59(4):314-318. 1975.
27. WILLARD, J.R. & PETROVICH, M.S. A direct centrifugal-flotation method for extraction of nematode from clay soils. *Plant Disease Reporter* 56(9): 808-810. 1972.