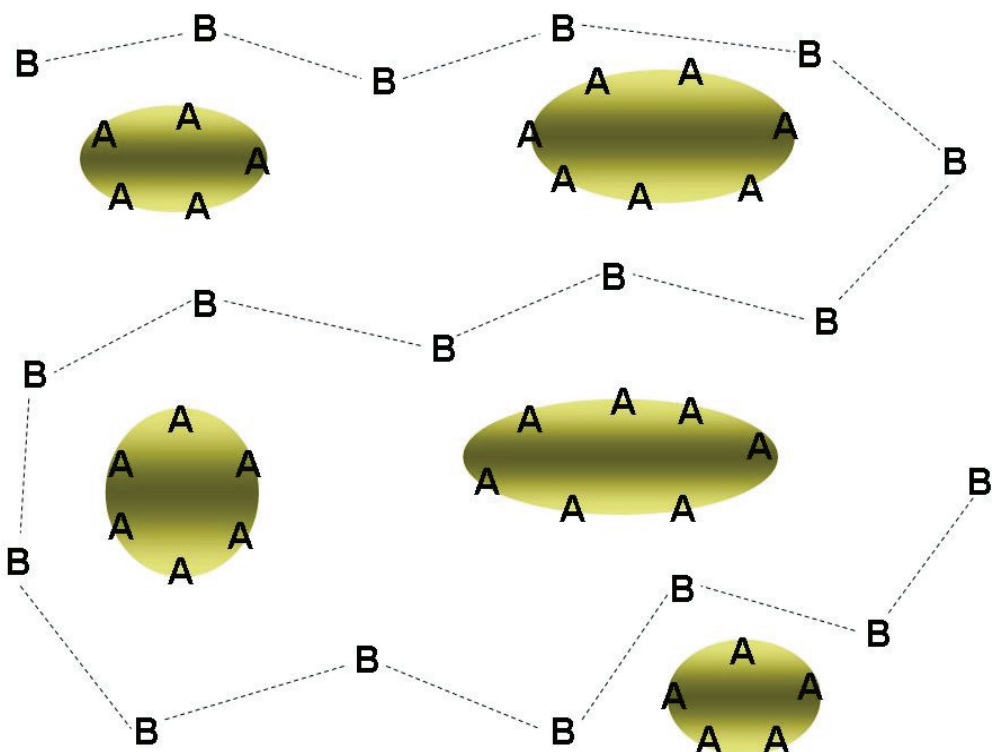


Análise Nematológica: importância e princípios gerais



ISSN 1517-5111

ISSN online 2176-5081

Julho, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 299

Análise Nematológica: importância e princípios gerais

Alexandre Moura Cintra Goulart

Embrapa Cerrados
Planaltina, DF
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Fernando Antônio Macena da Silva*

Secretária-Executiva: *Marina de Fátima Vilela*

Secretária: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Equipe de revisão: *Francisca Eljani do Nascimento*

Jussara Flores de Oliveira Arbués

Assistente de revisão: *Elizelva de Carvalho Menezes*

Normalização bibliográfica: *Paloma Guimarães Correa de Oliveira*

Editoração eletrônica: *Alexandre Moreira Veloso*

Capa: *Alexandre Moreira Veloso*

Impressão e acabamento: *Alexandre Moreira Veloso*

Divino Batista de Souza

1ª edição

1ª impressão (2010): tiragem 100 exemplares

Edição online (2010)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

G694a Goulart, Alexandre Moura Cintra.

Análise nematológica: importância e princípios gerais / Alexandre Moura Cintra Goulart. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2010.

45 p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, ISSN online 2176-5081 ; 299).

1. Nematóide. 2. Doença de planta-parasita. I. Título. II. Série.

632.625 7 - CDD 21

© Embrapa 2010

Autor

Alexandre Moura Cintra Goulart

Engenheiro Agrônomo, D.Sc.

Pesquisador, Embrapa Cerrados

goulart@cpac.embrapa.br

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Ailton Rocha Monteiro, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (Esalq/USP), pela orientação, apoio e colaboração, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo apoio concedido.

Apresentação

Nematoides fitoparasitas são vermes microscópicos que habitam o solo e atacam as plantas (geralmente as raízes ou outros órgãos subterrâneos), causando sérios danos às culturas agrícolas e acarretando prejuízos econômicos ao produtor rural.

Para a aplicação de estratégias de manejo de nematoides, é necessária a realização prévia de análise de nematoides, coletando amostras de solo e raízes e enviando a um laboratório de nematologia.

José Robson Bezerra Sereno
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução.....	11
Coleta de Amostras	13
Recepção de Amostras no Laboratório	28
Extração de Nematoides das Amostras.....	31
Fixação	35
Quantificação (contagem) de Nematoides.....	36
Preparo de Lâminas	38
Identificações Taxonômicas.....	39
Considerações Finais	40
Referências	41
Abstract.....	46

Análise Nematológica: importância e princípios gerais

Alexandre Moura Cintra Goulart

Introdução

Os nematoides são animais invertebrados, geralmente microscópicos, pertencendo a um filo próprio: Nematoda Potts, 1932 (MAGGENTI, 1981; BONGERS; FERRIS, 1999; HUGOT et al., 2001). Estima-se que existe 1 milhão de espécies de nematoides, das quais não mais que 20 mil já foram descritas (EISENBACK, 1998).

Entre os animais multicelulares, os nematoides são os mais abundantes. Constituem grupo altamente diversificado, incluindo formas com diversos hábitos alimentares e diferentes papéis ecológicos no solo. Os nematoides ocupam habitats mais variados que os de qualquer outro grupo de metazoários, salvo os artrópodos. São considerados organismos aquáticos, podendo viver em águas marinhas, águas doces ou películas de água do solo (MAGGENTI, 1981).

Nematoides fitoparasitas (ou fitonematoides) são vermes microscópicos que habitam o solo e atacam as plantas (geralmente as raízes ou outros órgãos subterrâneos), causando sérios danos às culturas agrícolas e acarretando prejuízos econômicos ao produtor rural. Pode-se afirmar que não há uma espécie de planta, cultivada ou não, que não seja hospedeira de uma ou mais espécies de fitonematoides. Entre

os nematoides de maior importância agrícola, podem ser citados:

Meloidogyne spp. (nematóide das galhas), *Pratylenchus* spp. (nematóide das lesões radiculares), *Heterodera glycines* Ichinohe (nematóide dos cistos da soja), *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira (nematóide reniforme), *Radopholus similis* (Cobb) Thorne (nematóide cavernícola), *Tylenchulus semipenetrans* Cobb (nematóide dos citros), entre outros (FERRAZ; MONTEIRO, 1995; WEISCHER; BROWN, 2001).

As perdas de produção em diversas culturas agrícolas, por causa de nematoides, estão em torno de 12%, em média (WEISCHER; BROWN, 2001), mas frequentemente ocorrem perdas maiores. Em relação ao nematóide *Pratylenchus brachyurus* Filipjev & Schuurmans Stekhoven, por exemplo, foram demonstradas perdas de até 30% na produção de soja em condições experimentais de campo nos Estados Unidos (SCHMITT; BARKER, 1981). No Brasil, há relatos frequentes de produtores informando reduções de até 30% — ou, em alguns casos, até 50% — na produção de soja em áreas infestadas, especialmente no Cerrado (PLANTIO DIRETO, 2007; GOULART, 2008). Outros nematoides fitoparasitas podem causar prejuízos semelhantes em várias culturas. Um levantamento de caráter mundial realizado no final do século XX revelou que as perdas econômicas globais na agricultura devidas ao parasitismo por nematoides eram da ordem de 78 bilhões de dólares por ano (WEISCHER; BROWN, 2001; LUC et al., 2005).

Para a aplicação de estratégias de manejo de nematoides, é necessária a realização prévia de análise em laboratório, coletando amostras de solo e raízes e enviando a um laboratório de nematologia que oferece o serviço de análises nematológicas. Não é possível fazer o diagnóstico correto de doenças causadas por nematoides somente com base em observação visual de sintomas no campo. A análise em laboratório especializado, portanto, é imprescindível para o manejo de nematoides. Os resultados da análise devem conter informações sobre a identificação e a quantificação das espécies de nematoides presentes no local, ou seja:

- a) Quais espécies de nematoides parasitas de plantas estão ocorrendo no local.
- b) Qual o nível populacional (ou número de indivíduos) de cada espécie.

Com base nessas informações, o profissional responsável terá condições de estabelecer um plano de ação para o manejo (ou controle) adequado de nematoides, visando reduzir ou eliminar os danos e prejuízos.

Coleta de Amostras

Os resultados de análises nematológicas devem expressar, de maneira mais confiável possível, a situação real no campo, em relação aos nematoides que ocorrem em um determinado local. Nesse sentido, é muito importante que a coleta de amostras no campo seja feita corretamente.

Distribuição de nematoides no campo

A distribuição espacial (no espaço) e temporal (ao longo do tempo) de nematoides no campo deve ser considerada cuidadosamente na amostragem.

Um modelo de distribuição (ou dispersão) de organismos é o arranjo desses organismos dentro do domínio a ser amostrado. Diferentes fatores podem influenciar a distribuição de organismos, como, por exemplo, disponibilidade de nutrientes, habitat apropriado para reprodução e sobrevivência, interação com outros organismos da mesma espécie ou diferentes espécies. O conhecimento prévio da distribuição dos organismos é importante no estabelecimento de um plano de amostragem. Os principais modelos de distribuição espacial e horizontal de patógenos de plantas são (AMORIM, 1995):

- Distribuição ao acaso: quando a distribuição dos organismos ocorre de maneira inteiramente casualizada (Figura 1A).

- Distribuição em agregados: quando os organismos tendem a se encontrar reunidos em grupos no campo (Figura 1B).
- Distribuição regular: quando os organismos estão uniformemente distribuídos em uma população (Figura 1C).

Um método simples para avaliar a distribuição horizontal de organismos baseia-se na média e na variância da amostra. Dessa forma, a distribuição em agregados caracteriza-se por apresentar valores de média inferiores aos da variância. Distribuição inteiramente ao acaso apresenta valores semelhantes para média e variância, enquanto distribuição regular mostra valores de média superiores aos da variância (BARKER, 1985; AMORIM, 1995).

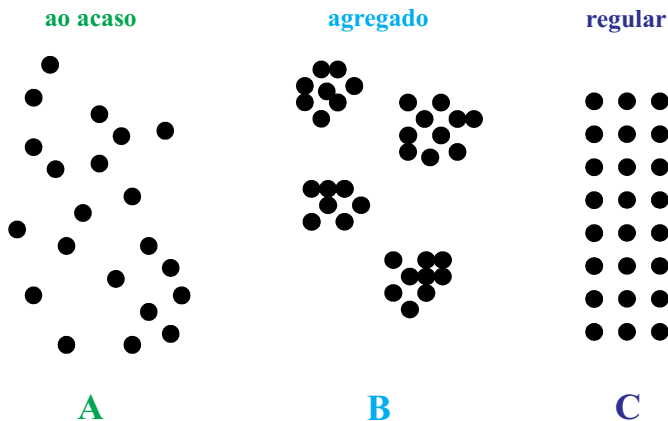


Figura 1. Tipos de distribuição espacial e horizontal de organismos: (A): ao acaso; (B): em agregados; (C): regular.

Fonte: adaptado de Amorim (1995).

No caso de nematoides, a distribuição espacial e horizontal é bastante desuniforme (desigual ou errática), ocorrendo tipicamente em agregados, podendo manifestar sintomas em reboleiras ou manchas no campo. Fitonematoides são muito mais numerosos ou abundantes em locais próximos às raízes de plantas e menos numerosos em outros locais. Esse padrão de distribuição deve ser considerado nos

planos de amostragem recomendados. A distribuição horizontal de nematoides é afetada pela presença de raízes, umidade, tipo de solo e outros fatores físicos e biológicos, incluindo o movimento de animais, enxurradas, máquinas e implementos (NORTON, 1978; BARKER, 1985; SHURTLEFF; AVERRE III, 2000; FREITAS et al., 2001).

A distribuição vertical (em profundidade no perfil do solo) de nematoides é muito variável, dependendo da cultura, espécie de nematoide e tipo de solo. Igualmente importante, as flutuações sazonais ou padrões de distribuição temporal variam de acordo com a cultura, espécie de nematoide e condições edafoclimáticas (BARKER, 1985).

Conceitos e objetivos da amostragem

A coleta de amostras (ou amostragem) é utilizada para obter informações que representem de modo mais fidedigno possível a realidade no local que se pretende amostrar. Considerando que não é possível analisar todo o volume de solo e de raízes que ocorrem em uma determinada área no campo, são coletadas amostras que devem representar adequadamente a realidade da lavoura e essas amostras são posteriormente analisadas em laboratório (SHURTLEFF; AVERRE III, 2000; FREITAS et al., 2001).

Os principais objetivos da amostragem para análise de nematoides são relacionados com atividades de (BARKER, 1985):

- Consultoria ou assistência técnica.
- Pesquisa científica.
- Quarentena ou prevenção.

Para a aplicação de manejo integrado de nematoides (consultoria ou assistência técnica), o principal objetivo da amostragem é relacionar os números e espécies de nematoides com o desenvolvimento da cultura, bem como selecionar e avaliar táticas de manejo. Por outro lado, projetos de pesquisa têm como objetivo importante a caracterização e

o entendimento da dinâmica de populações de nematoides. O objetivo de qualquer programa de quarentena ou prevenção é detectar os nematoides presentes e prevenir a disseminação dos mesmos. Os objetivos específicos devem estar bem definidos antes do planejamento das atividades de amostragem. O tipo e quantidade de dados necessários, assim como o plano e esquema de amostragem, dependem sempre dos objetivos da amostragem. Ao estabelecer os procedimentos de amostragem para atender a um propósito específico, o responsável deve estar familiarizado com a precisão e acurácia esperadas. Menores erros de precisão e acurácia são esperados quando os organismos estão distribuídos ao acaso no solo. Raramente, porém, nematoides apresentam distribuição ao acaso. Normalmente, nematoides ocorrem de maneira agregada (distribuição em agregados), resultando em erros muito maiores de exatidão (precisão e acurácia) da amostragem. Por exemplo, a amostragem para análise de nematoides apresenta com frequência erros de exatidão maiores que 10% ou 15%, em contraste com o erro esperado de até cerca de 10% em amostragens para análises de organismos que apresentam distribuição ao acaso. Dessa forma, nematoides que ocorrem em níveis populacionais baixos podem não ser detectados pela análise. Esse erro não pode ser eliminado completamente, mas pode ser minimizado, dentro do possível, seguindo as recomendações técnicas de coleta de amostras nematológicas (SOUTHWOOD, 1968; BARKER; NUSBAUM, 1971; BARKER; CAMPBELL, 1981; BARKER, 1985).

Planos de amostragem

Para qualquer patógeno vegetal, a escolha do plano de amostragem adequado depende da distribuição espacial da doença no campo. Para cada tipo de doença e dependendo também dos objetivos, pode-se utilizar um determinado plano ou padrão de amostragem. Os principais planos de amostragem para avaliação de doenças de plantas são os seguintes (MCSORLEY, 1987; AMORIM, 1995):

- Amostragem ao acaso: nesse caso, qualquer local do campo tem igual probabilidade de ser selecionado para amostragem. A

utilização de amostragem inteiramente casualizada é recomendada principalmente para doenças que se distribuem de maneira uniforme (modelo de dispersão regular) no campo. Como isso raramente ocorre, a amostragem ao acaso raramente tem sido empregada para avaliação de doenças de plantas. Nesse tipo de amostragem, as unidades a serem amostradas podem ser determinadas por tabelas casualizadas, figuras geradas por computador ou sorteio simples.

- Amostragem sistemática: em uma amostragem desse tipo, as amostras são coletadas de maneira sistemática, ou seja, as subamostras são retiradas em intervalos iguais e fixos. Por exemplo, a cada dez linhas, deve-se atravessar o talhão escolhendo-se como amostra uma planta a cada 20 m. Esse tipo de amostragem é muito usual em trabalhos que envolvem avaliação de doenças de plantas.

Tanto a amostragem ao acaso quanto a amostragem sistemática podem ser feitas em estratos, sendo nesse caso denominadas de amostragem estratificada. Esse plano de amostragem é recomendado para casos em que a população é heterogênea (dispersão em agregados). Nesse caso, antes de iniciar a amostragem, a área total deve ser dividida em estratos homogêneos, ou seja, áreas menores (subáreas), semelhantes em relação a várias características como, por exemplo, tipo de solo, relevo, altitude, topografia, histórico agrícola, cultura e variedade, etc. (AMORIM, 1995).

No caso de amostragens para análise de nematoides, as amostras devem ser coletadas de maneira estratificada e sistemática, considerando que a distribuição espacial-horizontal desses organismos no campo é agregada. Devem ser coletadas amostras compostas de várias subamostras. Quanto maior o número de subamostras coletadas para compor cada amostra, mais precisos e confiáveis serão os resultados. Segundo Barker (1985), cuja metodologia de coleta é amplamente aceita para trabalhos com nematoides parasitas de plantas, recomenda-se utilizar, no mínimo, 20 a 30 pontos de coleta para áreas de 1 ha a 2 ha. Alguns exemplos de esquemas para coleta de

amostras no campo são apresentados na Figura 2. Para realização de análises nematológicas em áreas de produção comercial, com objetivo de diagnóstico e planejamento do controle de nematoides, o esquema de amostragem mais utilizado e recomendado é em zigue-zague (Figura 2B).

Cares e Huang (2008) propuseram a padronização do sistema de amostragem para acessar a biodiversidade de nematoides em solos tropicais (para fins de pesquisa), estabelecendo pontos de coletas distribuídos em uma grade de amostragem com pontos equidistantes de 100 m, sendo que, em cada ponto (no cruzamento de duas linhas imaginárias), seria coletada uma amostra composta por 12 subamostras de solo, coleadas em pontos equidistantes (4 em um círculo de 6 m de diâmetro e, 8 em um círculo de 12 m de diâmetro), com cada subamostra coletada na profundidade de 0 cm a 20 cm (Figura 2C).

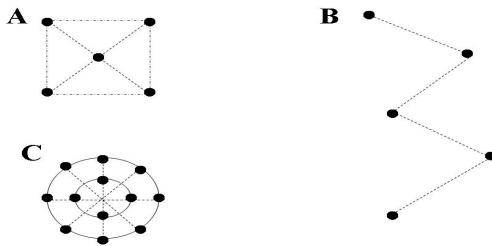


Figura 2. Exemplos de esquemas de amostragem para análise de nematoides. Cada pequeno círculo preenchido com a coloração escura (■) representa um ponto de coleta (ou subamostra). (A) Esquema de um quadrado: cinco subamostras compõem uma amostra composta (MATTOS, 1999); (B) esquema em zigue-zague (BARKER, 1985); (C) esquema de círculos concêntricos: 12 subamostras compõem uma amostra composta (CARES; HUANG, 2008).

Suficiência da amostragem

No caso de amostragem com o objetivo de diagnóstico de doenças causadas por nematoides e o planejamento de controle dessas doenças em áreas de produção comercial, pode-se adotar o critério de Barker (1985), em relação à suficiência da amostragem: utilizar, no mínimo, 20 a 30 pontos de coleta para áreas de 1 ha a 2 ha.

Para determinar a suficiência da amostragem em trabalhos de pesquisa, após a finalização das identificações taxonômicas dos nematoides presentes nas amostras coletadas, devem ser preparados gráficos representativos dos números acumulados de táxons de nematoides em relação ao número de amostras coletadas. Gráficos que relacionam o número de grupos taxonômicos (gêneros ou espécies, por exemplo) encontrados com o “esforço amostral” são fartamente estudados em ecologia, em relação a diversos organismos, com esse mesmo objetivo (Brewer, 1994; Goodell, 1982; Krebs, 1994; Magurran, 1988). Exemplos desse tipo de gráfico são apresentados nas Figuras 3 e 4 (amostras de solo e raízes, respectivamente). Nesse caso, as comunidades de nematoides foram estudadas em São Carlos (SP), em três diferentes ecossistemas, um de vegetação natural (Cerrado) e dois de agroecossistemas (cultura perene: pomar de goiaba; cultura anual: plantio de milho irrigado; ambas estabelecidas no Cerrado), por amostragens feitas em duas épocas do ano e cada amostra composta de três subamostras (Goulart, 2002; Goulart; Ferraz, 2005).

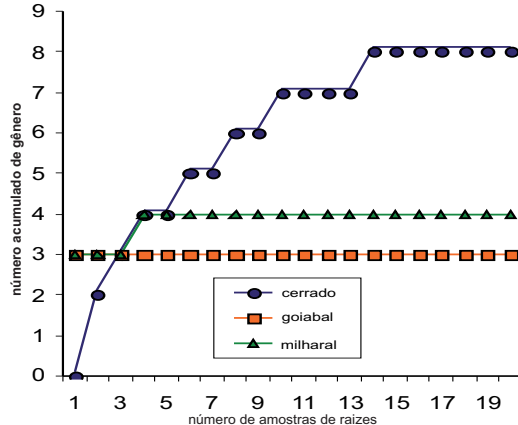


Figura 3. Números acumulados de gêneros de nematoides em relação ao número de amostras de solo coletadas em áreas de Cerrado, goiabal e milharal em São Carlos, SP (amostragens realizadas em maio de 1999 e fevereiro de 2000). Cada amostra composta de três subamostras.

Fonte: Goulart (2002).

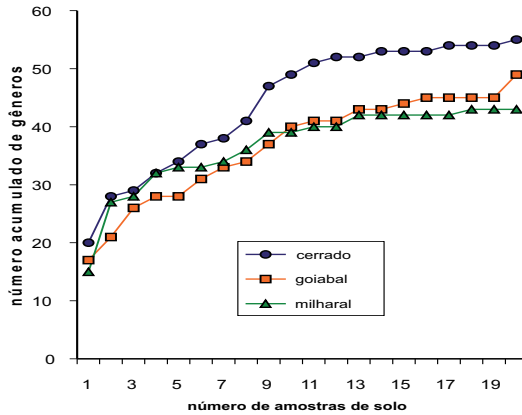


Figura 4. Números acumulados de gêneros de nematoides em relação ao número de amostras de raízes coletadas em áreas de Cerrado, goiabal e milharal em São Carlos, SP (amostragens realizadas em maio de 1999 e fevereiro de 2000). Cada amostra composta de três subamostras.

Fonte: Goulart (2002).

Recomendações gerais para coleta de amostras nematológicas

A seguir, são apresentadas recomendações gerais para coleta de amostras nematológicas. Vários textos da literatura nematológica (BARKER; NUSBAUM, 1971; EDWARD; MISRA, 1974; AYOUB, 1977; BARKER; CAMPBELL, 1981; GOODELL, 1982; BARKER, 1985; SOUTHEY, 1986; MCSORLEY, 1987; FORTUNER, 1991; LIMA, 1992; TIHOHOD, 1993; SHURTLEFF; AVERRE III, 2000; FREITAS et al., 2001; BRIDGE; STARR, 2007; FREITAS et al., 2007; KHAN, 2008) serviram de base para a elaboração dessas recomendações, especialmente Paschoal et al. (1995).

O que coletar

Solo e raízes devem ser coletados, sempre que possível. O solo a ser coletado deve ser proveniente da rizosfera. No caso de raízes, para a maioria dos casos recomenda-se coletar preferencialmente as radículas, ou seja, as raízes mais finas (raízes secundárias, terciárias, etc.). Em sua maioria, fitonematoides têm preferência por parasitar

raízes mais finas. Contudo, algumas vezes devem ser coletadas raízes lenhosas, pois algumas espécies encontram-se nessas raízes mais grossas e resistentes, como é o caso de cafeeiro parasitado por *Meloidogyne coffeicola* Lordello e Zamith. As raízes coletadas devem estar vivas. Assim, também poderão ser recuperados mais facilmente os nematoides ainda vivos. Para determinados grupos de nematoides, como o gênero *Meloidogyne* (nematoides formadores de galhas), há necessidade de obtenção de exemplares ainda vivos para a identificação de espécies (FERRAZ; MONTEIRO, 1995).

Geralmente, para trabalhos de pesquisa nas áreas de ecologia e diversidade de nematoides, são coletadas apenas amostras de solo. No entanto, amostras de raízes devem ser coletadas também, permitindo a obtenção de maior número de informações sobre as comunidades amostradas. Em alguns estudos realizados no Brasil, foi possível verificar que a coleta de raízes, além de solo, permitiu a identificação de certos gêneros-chave de nematoides fitoparasitas, especialmente os endoparasitas, como *Pratylenchus*, os quais possibilitaram a discriminação entre os tratamentos e áreas experimentais (GOULART, 2002, GOULART et al., 2003, GOULART et al., 2008a).

O responsável pela coleta de amostras deve certificar-se de que as raízes coletadas são mesmo da cultura. Raízes de culturas intercalares ou de plantas daninhas, devidamente identificadas, também podem ser coletadas e embaladas separadamente (PASCHOAL et al., 1995).

Em alguns casos especiais (como, por exemplo, algumas plantas ornamentais, certas palmáceas, morangueiro, arroz, alho, entre outras), os nematoides podem eventualmente parasitar órgãos aéreos: caules, folhas, flores, frutos ou sementes (FERRAZ; MONTEIRO, 1995). Havendo suspeita nesse sentido, com a orientação do profissional responsável, a parte aérea das plantas também deverá ser coletada.

Recomenda-se coletar amostras de solo com a umidade natural, evitando-se condições de encharcamento ou ressecamento.

Não se deve adicionar água ao solo naturalmente seco, para facilitar a coleta, nem depois, ao solo já coletado. A adição de água ao solo pode prejudicar a conservação adequada da amostra, devido à proliferação de microrganismos.

Quanto coletar

A quantidade de material em cada amostra coletada deverá ser 1 kg de solo e pelo menos 200 g de raízes finas (radicelas).

Para coletar raízes de culturas anuais, recomenda-se retirar uma ou duas plantas inteiras em cada ponto de amostragem (subamostra), e, em seguida, deve-se descartar a parte aérea das plantas e acondicionar essas raízes em saco plástico, juntamente com o solo, para assim obter cada amostra composta.

No caso de culturas anuais, para facilitar o trabalho de coleta no campo, deve-se coletar os sistemas radiculares inteiros (retirando a planta inteira e em seguida descartando a parte aérea), evitando assim a tarefa de separar raízes finas e grossas (essa parte será feita no laboratório, posteriormente). Ao retirar cada planta, deve-se também retirar, ao mesmo tempo, o solo que está ao redor das raízes, evitando assim o rompimento e perda de raízes finas na amostragem. Ao fazer a amostragem, nunca se deve puxar as plantas pela parte aérea, pois tal procedimento levaria ao rompimento e perda de muitas raízes finas. Cada planta deve ser retirada com cuidado, juntamente com o solo. O solo que envolve as raízes (e está mais próximo delas) é o solo que deve ser utilizado para a composição de cada amostra.

Muitos fitonematoides são comumente encontrados em maior número nas raízes e, em muitos casos, é necessário obter exemplares vivos das raízes para a correta identificação de espécies no laboratório. Portanto, é importante coletar raízes em quantidade suficiente e adequada, além do solo. Em especial no caso de raízes, é altamente desejável que cada amostra composta contenha de fato uma quantidade maior do que o mínimo de 200 g de raízes finas (radicelas).

Quando coletar

A época de florescimento da cultura é a ideal para realizar a análise de nematoides, pois, considerando que as plantas de culturas anuais já estão bem desenvolvidas e ainda não iniciaram a fase de senescência, os nematoides também poderão ser encontrados em níveis populacionais mais elevados. Assim, é possível planejar os cultivos seguintes, com base nos resultados de análises nematológicas. Muitos produtores têm se lembrado da importância de realização de análises de nematoides somente após a constatação de perdas na produção (final da safra). Porém, a fase de colheita das culturas anuais, assim como logo após a colheita e na entressafra, em geral não são fases adequadas para a realização dessas análises, porque as raízes se encontram em processo de envelhecimento e deterioração ou não estão mais presentes no solo.

Eventualmente, pode-se também coletar amostras na fase de pré-semeadura, após o preparo do solo. Porém, é muito importante destacar que essa amostragem antes da semeadura não elimina a necessidade de realizar também a amostragem na época de florescimento da cultura anterior, considerando os motivos já apresentados.

Onde coletar

Qualquer local onde as plantas não estão se desenvolvendo bem (levando em consideração também as condições de clima, fertilidade de solo, entre outras) pode ser uma área onde nematoides estão causando danos. Comumente são observadas reboleiras ou manchas no campo, devido ao ataque de nematoides (SHURTLEFF; AVERRE III, 2000). No entanto, com muita frequência, as doenças causadas por nematoides não manifestam sintomas visíveis ou esses sintomas são inespecíficos, podendo ser facilmente confundidos com sintomas relacionados com outras causas, como outras doenças, ataque de pragas, deficiência ou excesso de nutrientes, compactação ou encharcamento de solo, etc. (FERRAZ; MONTEIRO, 1995).

Em cada ponto de coleta, as amostras de solo e de raízes devem ser retiradas da camada de 0 cm a 20 cm ou 0 cm a 30 cm de

profundidade do solo. Em agroecossistemas, os nematoides são encontrados majoritariamente na faixa de 15 cm a 20 cm abaixo da superfície do solo (NORTON; NIBLACK, 1991), porém a distribuição vertical de nematoides em solos é bastante variável (BARKER, 1985). Pode-se também realizar amostragens separadamente em várias camadas de profundidade (GOULART et al., 2008b; TOMAZINI, 2008), dependendo dos objetivos. Quando há intenção de obter, em especial, nematoides dos gêneros *Longidorus* e *Xiphinema*, recomenda-se coletar amostras também em camadas mais profundas de solo, até 40 cm ou 50 cm, pois esses nematoides são encontrados com frequência em maiores profundidades (PASCHOAL et al., 1995).

Durante a amostragem, deve-se caminhar em zigue-zague no local (Figura 5); coletar amostras junto às plantas com sintomas moderados, evitando-se aquelas muito atacadas e já gravemente depauperadas; se houver manchas ou reboleiras, amostrar em suas periferias ou margens, especialmente se os sintomas forem muito severos nas plantas da parte mais central das reboleiras. Além da amostragem nas reboleiras, pode-se fazer também, separadamente, amostragem nas áreas fora das reboleiras (áreas aparentemente sem problemas), constituindo assim dois tipos de amostras: (A) das reboleiras; (B) de áreas próximas, com plantas aparentemente saudias, conforme a Figura 6 (PASCHOAL et al., 1995; SHURTLEFF; AVERRE III, 2000).

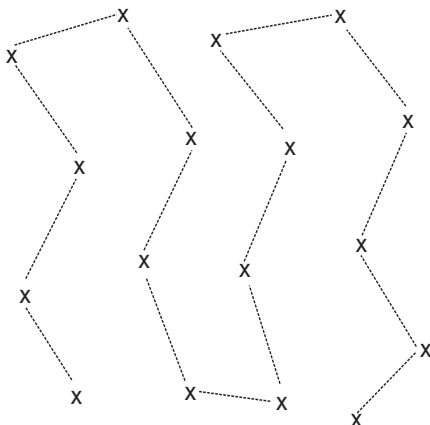


Figura 5. Coleta de amostras de solo e raízes em área sem reboleiras de plantas com sintomas; as subamostras tiradas nos pontos assinalados com "X" formarão a amostra composta.

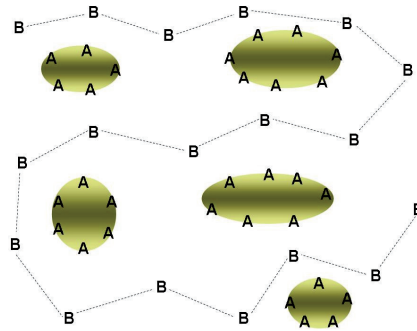


Figura 6. Coleta de amostras de solo e raízes em área com reboladeiras de plantas com sintomas; as subamostras tiradas nos pontos assinalados com a letra A, nos bordos das reboladeiras, formarão a amostra composta A; as subamostras dos pontos assinalados com a letra B, de plantas aparentemente saudáveis, formarão a amostra composta B.

No caso de vegetação arbórea, as amostras devem ser retiradas de pontos próximos à linha de projeção da copa, onde as raízes mais jovens e ativas podem ser encontradas (BARKER, 1985; FORTUNER, 1991).

Como coletar

Cada amostra composta deve ser formada por subamostras (de solo e raízes) coletadas em áreas semelhantes (ou, preferencialmente, uniformes ou homogêneas) em relação a várias características, principalmente tipo de solo, histórico agrícola e topografia. As subamostras devem ser postas em um balde grande e bem misturadas de modo a constituir amostra composta representativa da área. Recomenda-se coletar, no mínimo, 10 a 30 subamostras por hectare para formar uma amostra composta. Eventualmente, quando as condições do local forem de fato homogêneas, pode-se obter uma amostra composta representativa de uma área de vários hectares. Nesse caso, recomenda-se a utilização do maior número possível de subamostras para formar cada amostra composta (no mínimo, 10 a 30 subamostras por hectare). Se a área for muito grande, mesmo que aparentemente homogênea, recomenda-se dividi-la em quadrantes de, preferencialmente, 2 ha (ou, no máximo, 10 ha); selecionar pelo menos

5 a 10 quadrantes e retirar uma amostra composta de cada quadrante selecionado. O responsável pela coleta deve utilizar o bom senso para a definição do número de subamostras e amostras que irá representar a área. Quanto maior o número de subamostras e de amostras, obviamente, mais precisos e confiáveis serão os resultados da análise.

É importante destacar que, sempre, em cada ponto de coleta (subamostra), raízes devem ser coletadas, e não apenas solo. Portanto, cada subamostra (obtida em cada ponto de coleta) e cada amostra devem conter, necessariamente, solo e raízes.

As subamostras de solo ou raízes podem ser obtidas com uso de enxadões, enxadas, pás retas, trados-de-solo ou equipamentos afins. Em geral, os trados-de-solo facilitam a retirada padronizada das subamostras. Com enxadão ou enxada, deve-se fazer uma cova em “V” e retirar uma fatia de espessura uniforme de uma de suas paredes. Com pá reta, deve-se fazer cova cilíndrica ou trapezoidal e retirar a fatia de um lado vertical.

Para amostragem em viveiros de mudas, deve-se escolher ao acaso dez ou mais mudas para cada lote de mil, considerando plantas da mesma espécie e variedade, além de mesmo tipo de solo, atentando para mudas enfezadas ou subdesenvolvidas, fazendo amostragem separada para elas. Para maior facilidade de embalagem e transporte até ao laboratório, no caso de mudas crescidas, poderá ser eliminada a parte aérea das plantas, realizando-se o corte do caule logo acima do nível do solo. Muitas vezes não é necessário coletar as mudas inteiras, bastando parte de suas radículas e do solo ao redor delas.

Acondicionamento, identificação e transporte das amostras

As amostras de solo e de raízes, juntas, deverão ser acondicionadas em sacos plásticos, de paredes grossas e resistentes, bem fechados e devidamente identificados.

Fichas e etiquetas contendo o maior número possível de informações deverão acompanhar as amostras: número ou código da amostra, local (propriedade, município, estado e país), proprietário, cultura atual (nomes científico e vulgar), variedade ou cultivar, idade ou estágio das plantas, área amostrada, danos e sintomas (descrição, distribuição e porcentagem de plantas atacadas), histórico agrícola (culturas anteriores, mencionando pelo menos os últimos quatro anos), tipo de solo, tipo de preparo de solo ("plantio" direto, convencional ou outro), plantas daninhas ocorrentes, tratos culturais realizados (especialmente irrigação e produtos químicos aplicados), condições climáticas nos últimos 15 dias, nome do coletor, data da coleta, culturas futuras desejadas (opções) e outras observações de interesse.

As amostras devem ser enviadas ao laboratório nematológico com a maior rapidez possível. Nunca se deve deixar as amostras em ambiente aquecido pela exposição ao sol, pois o aquecimento e a incidência de luz podem prejudicar a conservação das amostras, causando a morte de nematoides. Caixas térmicas ou de isopor são indicadas para o acondicionamento de amostras durante o transporte ao laboratório. É importante que as amostras nunca sejam colocadas em congelador, pois o resfriamento excessivo também é prejudicial para nematoides. Amostras adequadamente embaladas podem ser mantidas em geladeira, regulada para temperatura mais elevada, por no máximo 3 a 4 dias, na impossibilidade de encaminhá-las imediatamente ao laboratório. Temperaturas de 10 °C a 15 °C prolongam a sobrevivência de nematoides nas amostras, mas abaixo de 8 °C podem lhes causar danos.

Queda e compressão das amostras também podem ser prejudiciais para certos nematoides, especialmente dos gêneros *Trichodorus*, *Paratrichodorus*, *Longidorus* e *Xiphinema*. Produtos químicos também podem afetar as amostras, portanto elas devem ser acondicionadas em recipientes limpos e sem resíduos tóxicos.

Recepção de Amostras no Laboratório

Quando as amostras são trazidas pessoalmente pelos interessados ao laboratório, orientações e informações gerais devem ser dadas sobre a análise que será realizada. Esse é o momento para se verificar com os interessados, inclusive, se a coleta de amostras foi feita corretamente. Além disso, é importante que os interessados forneçam todas as informações necessárias à análise, preenchendo uma ficha de identificação de amostra nematológica (uma ficha deve ser preenchida para cada amostra encaminhada ao laboratório). Na Figura 7, apresenta-se um exemplo dessa ficha.

É importante que o interessado entre em contato com o laboratório antes de realizar a coleta de amostras, para obter as orientações sobre como proceder a coleta corretamente e também para verificar a disponibilidade do laboratório em receber as amostras. Assim, a ficha de identificação de amostra poderá ser enviada ao interessado, antes da realização da coleta, a qual pode ser preenchida logo após a coleta. Desse modo, no caso de envio das amostras pelo correio ou transportadora, a ficha deve ser anexada a cada amostra. Assim, o laboratório terá todas as informações necessárias para a análise.

Laboratório de Nematologia – Embrapa Cerrados Ficha de Identificação de Amostra Nematológica

Identificação da amostra:			
Data de coleta:		Data de recebimento no laboratório:	
		Data de processamento no laboratório:	
Cultura:		Variedade:	
Responsável pela coleta (nome e telefone):			
Propriedade ou empresa:			
Proprietário:		Telefone:	
Município:		Estado:	

Continua....

Figura 7. Continuação.

Idade, fase ou estágio das plantas:					
Origem das sementes:				Data de plantio:	
Área com a cultura (ha):				Área com problema (ha ou %):	
Estimativa de perda de produção (%):					
Ataque em reboleiras ou manchas?		SIM ()		NÃO ()	
Galhas ou engrossamentos nas raízes?		SIM ()		NÃO ()	
Lesões escurecidas nas raízes?		SIM ()		NÃO ()	
Observações de campo, sintomas e danos (favor utilizar quantas linhas forem necessárias):					
Suspeita (especificar possíveis causas do problema):					
Outras doenças e pragas atacando a cultura:					
Culturas anteriores (pelo menos 5 últimos anos, em ordem, da mais recente até a mais antiga, incluindo todas as espécies que foram cultivadas):					
Costuma deixar a área sem plantio na entressafra?		SIM ()		NÃO ()	
Rotação de cultura:		SIM ()	NÃO ()	Quais?	
Sucessão de cultura:		SIM ()	NÃO ()	Quais?	
Safrinha?		SIM ()	NÃO ()	Quais?	
Utiliza plantas de cobertura ou adubação verde?		SIM ()	NÃO ()	Quais?	
Plantas daninhas ocorrentes:					
Tipo de solo:				pH do solo (valor aproximado):	
Textura do solo:		Arenosa ()	Média ()	Argilosa ()	Muito argilosa ()
Preparo do solo:					
Adubação química - quais adubos, quando e em qual dosagem (ou quantidade) foram aplicados:					
Adubação orgânica - quais tipos de adubos, quando e em qual dosagem (ou quantidade) foram aplicados:					
Calagem - qual tipo de calcário, quando e em qual dosagem (ou quantidade) foi aplicado:					

Continua....

Figura 7. Continuação.

Controle de plantas daninhas:						
Químico, com herbicidas ()			Mecânico ()		Manual ()	
Ótimo ()	Bom ()	Regular ()		Ruim ()	Péssimo ()	
Defensivos (informar os produtos e quando foram aplicados):						
Herbicidas:						
Inseticidas:						
Fungicidas:						
Nematicidas:						
Ocorrência de chuvas nos últimos 30 dias:			SIM ()			NÃO ()
Área irrigada:	SIM ()	NÃO ()	Tipo de irrigação:			
Outras observações:						
DADOS COMPLETOS DO INTERESSADO (PARA ENVIAR O RESULTADO):						
Nome:						
Empresa:						
Propriedade:						
Endereço:						
Município:			Estado:		CEP	
Telefones:						
Fax:			Celular:			
E-mail:						

Figura 7. Exemplo de ficha de identificação de amostra nematológica, utilizada para recepção de amostras no laboratório.

Extração de Nematoides das Amostras

Para que os nematoides possam ser visualizados, identificados e contados, durante os procedimentos da análise nematológica, há necessidade de que eles sejam primeiramente extraídos das amostras de solo e raízes.

Nematoides são organismos essencialmente aquáticos, podendo viver em águas marinhas, águas doces ou películas de água do solo (MAGGENTI, 1981). Aqueles que habitam o solo, na verdade, vivem na água do solo, ou seja, a água que ocupa os microporos e envolve as partículas de solo. A movimentação dos nematoides no solo ocorre entre as partículas e no filme de água. O tamanho dos poros ou interstícios maiores permite uma movimentação mais dinâmica, e, principalmente quando eles são de diâmetro maior que o corpo dos nematoides, transformam-se, com auxílio da água presente no solo, em canais por onde os nematoides movimentam-se no solo (TIHOHOD, 1993).

Para que seja realizada a análise nematológica, os nematoides devem ser visualizados com microscópio ótico, para que possam ser identificados e contados (quantificados). Para tanto, os nematoides devem ser extraídos do solo, primeiramente. No caso de nematoides que estão no interior das raízes (ou associados a elas), eles devem também ser extraídos das mesmas, primeiramente. Alguns nematoides podem ser encontrados em outros órgãos vegetais, inclusive órgãos aéreos (folhas, flores ou sementes, por exemplo). Nesses casos, também há necessidade de extração dos nematoides, que é feita de modo semelhante à extração de raízes (TIHOHOD, 1993).

No caso de amostras de solo, a extração consiste em basicamente separar os nematoides das partículas de solo e matéria orgânica. E no caso de amostras de raízes (ou qualquer tecido vegetal), a extração consiste basicamente em separar os nematoides dos tecidos vegetais.

Essas separações são necessárias ao processo de análise nematológica, ou seja, visualização ao microscópio ótico, identificação e contagem (quantificação) dos nematoides. Porém, essas separações, na prática, não são totais ou perfeitas, pois no final sempre restam, em certa quantidade, partículas de solo, matéria orgânica e tecidos indesejáveis. Dessa forma, o que se busca é que o método de extração seja o mais eficiente possível para permitir que a quantidade de resíduos e partículas indesejáveis seja a menor possível, no final do processo, obtendo-se uma suspensão aquosa mais pura possível, contendo os nematoides presentes na amostra.

Vários métodos de extração podem ser utilizados em laboratório de nematologia. Os métodos mais frequentemente utilizados nos laboratórios especializados serão descritos a seguir. Vários textos da literatura nematológica (EDWARD; MISRA, 1974; AYOUB, 1977; GOODELL, 1982; SOUTHEY, 1986; MCSORLEY, 1987; TIHOHOD, 1993; SHURTLEFF; AVERRE III, 2000; FREITAS et al., 2001; FREITAS et al., 2007; KHAN, 2008) serviram de base para a elaboração dessas recomendações, especialmente Paschoal et al. (1995).

Diferentes métodos de extração conhecidos podem ser, eventualmente, combinados em uma sequência de etapas ou fases (cada método, nesse caso, é considerado uma etapa ou fase da metodologia completa). Os principais métodos de extração serão descritos de forma geral e separadamente, a seguir.

Peneiramento

A passagem do material a ser analisado (solo ou raízes, geralmente, podendo ser qualquer substrato ou tecido vegetal) através de peneiras, com adição de água, é um método de extração bastante utilizado. Considerando que a simples passagem por peneiras não permite a obtenção de suspensão aquosa suficiente pura – ou seja, com o uso desse método, a suspensão aquosa final ainda contém normalmente grande quantidade de resíduos indesejáveis (partículas de solo, matéria orgânica ou tecidos vegetais) –, então esse método geralmente é

associado a outros métodos, sendo, na verdade, a primeira etapa do processo de extração, na maioria das vezes.

Vários tipos de peneiras são utilizadas para extração de nematoides. Essas são as mesmas peneiras que também são utilizadas para análise granulométrica de solo. A literatura classifica as peneiras pela unidade britânica “mesh”, que significa o número de aberturas por polegada linear da malha da peneira, ou pelo sistema métrico, ou seja, diâmetro da abertura da malha da peneira em milímetros ou micrômetros (FREITAS et al., 2007). Na Tabela 1, apresentam-se os tipos de peneiras mais utilizadas em laboratório de nematologia, conforme a classificação em “mesh” ou pelo sistema métrico.

Tabela 1. Tipos de peneiras mais utilizadas em laboratório de Nematologia, conforme a classificação em “mesh” (número de aberturas por polegada linear da malha da peneira) ou pelo sistema métrico (diâmetro da abertura da malha da peneira em milímetros).

Mesh	Milímetros (mm)
20	0,840
60	0,250
80	0,177
100	0,150
200	0,074
325	0,044
400	0,037
500	0,025

Fonte: Freitas et al., 2007.

No caso de amostras de tecidos vegetais (raízes, na maioria das vezes), há necessidade de fragmentar os tecidos em liquidificador, antes do peneiramento. O peneiramento é feito sempre começando pela peneira com maior abertura de malha e deixando por último a peneira com menor abertura de malha, ou seja, em ordem decrescente de aberturas

de malha das peneiras. Assim, o processo inicia-se com a retenção de materiais mais grosseiros (pedras, restos vegetais maiores, insetos, etc.), até a retenção de materiais mais finos, de menor tamanho (partículas de solo e matéria orgânica), deixando passar os nematoides pelas aberturas das peneiras, com exceção da última peneira utilizada no processo (peneira de 400 ou 400 mesh), que retém os nematoides, inclusive.

Todo o processo de peneiramento é feito com água. No caso de amostra de solo, logo no início do processo, deve-se adicionar aproximadamente 5 litros de água ao solo, em um balde, e, em seguida, destrorroar bem o solo com as mãos, usando luvas; a seguir, agitar bem o material (solo + água) e, logo após, deixar em repouso, por cerca de 30 segundos, para sedimentar parte das partículas de solo (aquelas mais pesadas) no fundo do balde. A sedimentação parcial de partículas, antes de proceder o peneiramento, auxilia na obtenção de suspensões aquosas de nematoides de maneira mais eficiente, com menor quantidade de resíduos indesejáveis.

Centrifugação

Após o peneiramento, para dar continuidade ao processo de extração, pode ser realizada a centrifugação do material. O processo de peneiramento seguido de centrifugação, para amostras de solo, é chamado método de Jenkins (Jenkins, 1964) e, para amostras de tecido vegetal (raízes, por exemplo), é chamado de método de Coolen & D'Herde (Coolen; D'Herde, 1972). Normalmente, a centrifugação é feita duas vezes, sendo a primeira em água, por 5 minutos a 1.750 rpm e a segunda em solução de sacarose (400g de açúcar em 750 mL de água), por 1 minuto, também a 1.750 rpm. Ao final da primeira centrifugação, os nematoides ficam depositados no fundo do tubo da centrífuga, juntamente com outros sedimentos, e materiais mais leves, como matéria orgânica, ficam no sobrenadante. Esse sobrenadante é, então, descartado, para, em seguida, ser realizada

a segunda centrifugação. Ao final da segunda centrifugação, os nematoides ficam no sobrenadante, pois a solução de sacarose que é utilizada possui densidade ligeiramente superior à densidade do corpo dos nematoides. Dessa forma, os nematoides ficam em suspensão no sobrenadante e os resíduos (partículas de solo e matéria orgânica restante) ficam no fundo do tubo. Dessa forma, é realizada a separação final entre os nematoides (sobrenadante) e os resíduos indesejáveis (fundo do tubo). O sobrenadante, então, com os nematoides, é vertido em uma peneira de abertura de malha bastante pequena (500 mesh: 0,025 mm de abertura de malha), retendo os nematoides na superfície dessa peneira. Em seguida, os nematoides são transferidos da superfície da peneira para um frasco de vidro, com uso de água. Assim, obtém-se a suspensão aquosa com os nematoides extraídos da amostra (o termo correto é suspensão, e não solução, pois os nematoides encontram-se suspensos em água, e não dissolvidos).

Fixação

Após a finalização da extração, é obtida uma suspensão aquosa de nematoides (uma suspensão é obtida para cada amostra de solo ou de raízes, ou de qualquer outro tecido vegetal). Para que os nematoides presentes em cada suspensão sejam conservados adequadamente, há necessidade de que o material seja fixado, geralmente com formol, evitando a deterioração por microrganismos (fungos e bactérias). Em geral, antes da fixação com formol, os nematoides devem ser mortos pelo aquecimento gradual até 55 °C a 65 °C. O aquecimento deve ser gradual, em “banho-maria” e fogo baixo, para permitir que os nematoides permaneçam, mesmo depois de mortos, com musculatura relaxada, facilitando assim a identificação posterior dos espécimes. Após a morte dos nematoides, então o formol é adicionado às suspensões, de modo a resultar uma concentração em torno de 2% a 4% de formol em cada suspensão. Assim, o material é conservado por vários meses ou até mesmo anos (HOOPER, 1986).

Quantificação (contagem) de Nematoides

Após a fixação do material, a etapa seguinte é a quantificação (contagem) de nematoides presentes. O resultado de uma análise nematológica deve conter dados qualitativos (identificações de gêneros e espécies de nematoides) e quantitativos (números de exemplares de nematoides de cada gênero ou espécie). Uma alíquota (uma parte) de cada suspensão aquosa com nematoides é utilizada para contagem, geralmente entre 10% e 30% do volume total da suspensão, no mínimo.

Após a contagem, os números obtidos são transformados para expressar números referentes ao volume total da suspensão. Por exemplo, se a suspensão é de 10 mL e a alíquota utilizada para contagem é de 2 mL (20%), então os números de nematoides contados em 2 mL são multiplicados por 5, para se obter os números referentes ao volume total da suspensão. Obtém-se, geralmente, um número para cada gênero de nematoide presente na amostra.

As espécies também são identificadas, mas, no caso de haver mais de uma espécie pertencente a um determinado gênero, normalmente não se sabe quantos exemplares ocorrem de cada espécie, mas apenas o número de exemplares daquele gênero. Isso ocorre porque a contagem é feita, rotineiramente, por observação visual direta das suspensões aquosas, sem o preparo de lâminas de microscopia. Dessa forma, o aumento microscópico que normalmente é utilizado é de 100 vezes (ou às vezes 400 ou 450 vezes), não permitindo a identificação de espécies, nessa etapa. A identificação de espécies, quando é realizada com base na morfologia dos nematoides, geralmente exige o preparo de lâminas de microscopia e observação e estudo microscópico mais detalhados, com aumento de 1.000 vezes ou mais. E, muitas vezes, além do estudo microscópico, com base na morfologia, a identificação de espécies exige também o uso de outros métodos, como, por exemplo, a eletroforese de isoenzimas ou técnicas moleculares. Como

exemplo, um possível resultado de análise nematológica é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Exemplo de resultado de análise nematológica, referente a uma única amostra (solo e raízes) de cultura de soja (os números são referentes a 200 g de solo e 5 g de raízes).

	<i>Hel</i>	<i>Mel</i>	<i>Praty</i>	<i>Xiph</i>	Ovos	V.L.
Solo	30	20	10	10	16	55
Raízes	10	30	40	-	14	-

Hel: gênero *Helicotylenchus* (nematoides espiralados); *Mel*: gênero *Meloidogyne* (nematoides de galhas); *Praty*: gênero *Pratylenchus* (nematoides das lesões radiculares); *Xiph*: gênero *Xiphinema*; Ovos: ovos de nematoides; V.L.: nematoides de vida livre, não fitoparasitas.

Espécies identificadas: *Helicotylenchus dihystrera*; *Meloidogyne javanica*; *Pratylenchus brachyurus*; *Pratylenchus zeae*.

Para facilitar a contagem, que é feita sob microscópio ótico, pode-se utilizar uma lâmina especial chamada de lâmina de Peters. Essa lâmina apresenta um desenho quadriculado, com 24 quadrados. Um esquema dessa lâmina é apresentado na Figura 8. Na verdade, a “lâmina de Peters”, assim chamada corriqueiramente, trata-se de duas lâminas, uma sobre a outra, deixando um espaço ou “câmara” entre as duas lâminas. É nesse espaço ou “câmara” que é colocada a suspensão de nematoides para contagem (1 mL na região quadriculada e mais 1 mL fora dessa região). Por esse motivo, a lâmina de Peters também é chamada, mais corretamente, de câmara de Peters. O trabalho de contagem consiste em percorrer os quadrados, visualizando e contando os nematoides e, ao mesmo tempo, identificando-os em nível de gênero. Assim, ao final da contagem, estarão disponíveis informações qualitativas (gêneros de nematoides presentes) e quantitativas (números de nematoides de cada gênero). Para o aprofundamento das informações qualitativas, com as identificações de espécies, há necessidade de se proceder as etapas seguintes: preparo de lâminas e identificações taxonômicas (SOUTHEY, 1986).

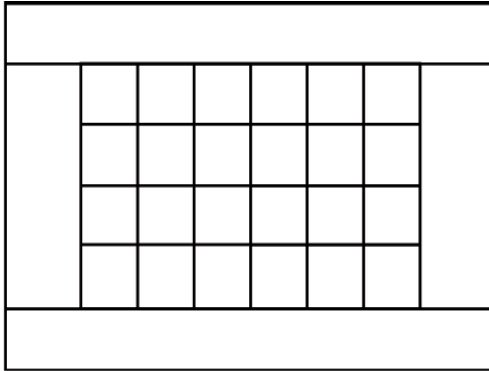


Figura 8. Esquema da lâmina de Peters, utilizada para contagem de nematoides sob microscópio óptico.

Preparo de Lâminas

Para a realização do trabalho de identificação de espécies e estudos taxonômicos de nematoides, há necessidade de que, primeiramente, sejam preparadas lâminas de microscopia desses organismos, para que eles possam ser observados e estudados sob microscópio óptico, com uso dos maiores aumentos (ampliação da imagem), ou seja, 1.000 vezes ou mais.

Para o preparo de lâminas, inicialmente, os nematoides que estão em suspensão aquosa devem ser “pescados”, com uso de agulha especial, sob microscópio estereoscópico, vulgarmente chamado de “lupa”. Assim, os nematoides são transferidos, um a um, para uma gota na superfície da lâmina. Essa gota pode ser de formalina (solução de formol, geralmente na concentração 2%) ou de glicerina. No caso de lâminas temporárias, para trabalhos de rotina, a formalina é utilizada, e, no caso de lâminas “permanentes”, para estudos taxonômicos que exigem a preservação dos espécimes por longos períodos, a glicerina é utilizada. Após transferir vários nematoides (no mínimo 10) para a gota na superfície da lâmina, procede-se a vedação da lâmina com parafina histológica (HOOPER, 1986; TIHOHOD, 1993; PASCHOAL et al., 1995).

Identificações Taxonômicas

Identificações taxonômicas de nematoides são feitas, sempre que possível, até nível de espécie e são realizadas por meio de estudos morfológicos (qualitativos e biométricos) e consulta a chaves taxonômicas, com auxílio, por exemplo, da seguinte literatura básica: Thorne (1961); Goodey (1963); Heyns (1971); Andrassy (1976); Kirjanova e Krall (1977); Krall (1990); Maggenti (1981); Nickle (1991); Jairajpuri e Ahmad (1992); Hunt (1993); Decraemer (1995); May e Mullin (1996); Tihohod (1997); Cares e Huang (2000); Siddiqi (2000); Cares e Huang (2001). Para auxiliar o trabalho de identificações taxonômicas, normalmente também são preparados cadernos de identificação, por meio de levantamento atualizado de grupos taxonômicos; obtenção de cópias xerográficas das chaves taxonômicas; descrições e redescrições dos diferentes grupos taxonômicos; compilação do material.

Além de estudos com uso de microscópio (óptico ou eletrônico), que se baseiam na morfologia dos nematoides, pode-se também utilizar outras técnicas, por exemplo, eletroforese de isoenzimas e métodos moleculares.

O primeiro passo para a identificação taxonômica consiste em observar se o nematoide possui ou não estilete. Esse aspecto é importante, pois os nematoides fitoparasitas utilizam o estilete para se alimentar no tecido vegetal. Se o nematoide não possui estilete, então pode-se concluir, com certeza, que ele não é fitoparasita. Mas, se o nematoide possui estilete, ele pode ser fitoparasita ou não. Nem todo nematoide que possui estilete é fitoparasita, pois existem nematoides que utilizam o estilete para se alimentar de fungos ou de pequenos animais habitantes do solo. Então, pode-se dizer que a presença do estilete é condição necessária ao fitoparasitismo, mas não suficiente. Na Figura 9, apresentam-se ilustrações da região anterior de diferentes nematoides, com ou sem estilete.

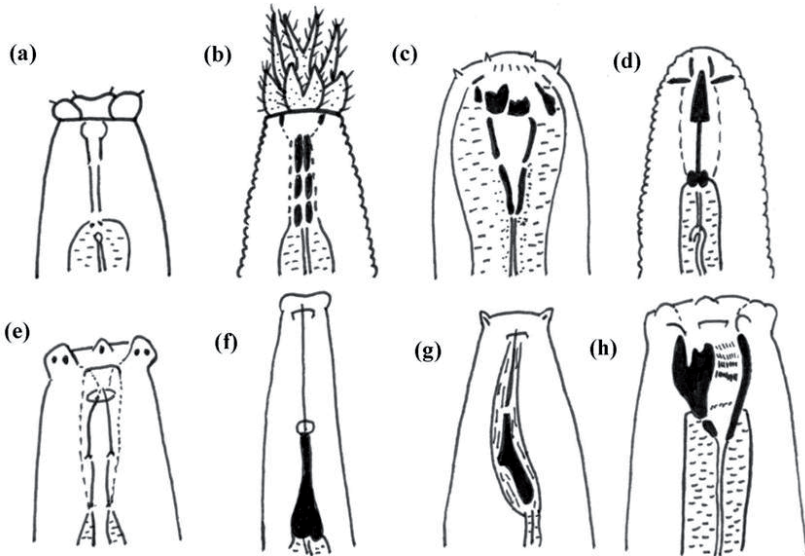


Figura 9. Morfologia da região anterior e cavidade bucal de nematoides de solo. (a) *Rhabditis* (bacteriófago); (b) *Acrobelles* (bacteriófago); (c) *Diplogaster* (bacteriófago, predador); (d) representante da subordem *Tylenchina* (parasita de plantas, micófago, predador); (e) *Dorylaimus* (onívoro); (f) *Xiphinema* (parasita de plantas); (g) *Trichodorus* (parasita de plantas); (h) *Mononchus* (predador). Nematoides com estilete: (d), (e), (f) e (g).

Fonte: Adaptado de Yeates e Coleman (1982).

Considerações Finais

A realização de análise nematológica é essencial para a diagnose de doenças causadas por nematoides em culturas agrícolas. A simples observação de sintomas no campo não permite a diagnose de doenças causadas por esses patógenos, dessa forma, há necessidade de coletar amostras e enviar a um laboratório especializado em nematologia, que oferece o serviço de análise nematológica. Somente com a correta diagnose, incluindo informações qualitativas (identificações de gêneros e espécies de nematoides presentes) e quantitativas (níveis populacionais de cada nematoide encontrado), é que será possível estabelecer estratégias de manejo dos nematoides fitoparasitas em um determinado local, visando minimizar os danos e prejuízos.

A análise nematológica é um processo laboratorial especializado e complexo, exigindo equipamentos e materiais próprios, bem como pessoal capacitado e treinado, incluindo um nematologista responsável e assistentes. A ordem das principais etapas da análise nematológica, desde a fase que ocorre no campo, são: coleta de amostras; acondicionamento, identificação e transporte das amostras; recepção de amostras no laboratório; extração de nematoides das amostras; fixação; quantificação (contagem) de nematoides; preparo de lâminas; identificações taxonômicas de nematoides.

Referências

- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo, SP: Ceres, 1995. p. 647-671. v.1,
- ANDRÁSSY, I. **Evolution as a basis for the systematization of nematodes**. London: Pitman, 1976. 288 p.
- AYOUB, S.M. **Plant nematology**: an agricultural training aid. Sacramento: Department of Food and Agriculture; State of California, 1977.
- BARKER, K. R. Sampling nematode communities. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). **An advanced treatise on meloidogyne**: methodology. Raleigh: North Carolina State University/USAID, 1985. p. 3-17.
- BARKER, K. R.; CAMPBELL, C. L. Sampling nematode populations. In: ZUCKERMAN, B. M.; ROHDE, R. A. (Ed.). **Plant parasitic nematodes**. New York: Academic Press, 1981. p. 451-473. v.3.
- BARKER, K. R.; NUSBAUM, C. J. Diagnostic and advisory programs. In: ZUCKERMAN, B.M.; MAI, W.F.; ROHDE, R.A. (Ed.). **Plant parasitic nematodes**. New York: Academic Press, 1971. p. 281-301. v.1.
- BONGERS, T.; FERRIS, H. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 224-228, 1999.
- BREWER, R. Community and ecosystem ecology. In: BREWER, R. **The science of ecology**. Ft Worth: Saunders College/Harcourt Brace College, 1994. p. 263-306.
- BRIDGE, J.; STARR, J. L. **Plant nematodes of agricultural importance**: a color handbook. Boston: Academic Press, 2007. 152 p.

CARES, J. E.; HUANG, S. P. Taxonomia atual de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros: parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 185-223, 2000.

CARES, J. E.; HUANG, S. P. Taxonomia de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros: parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 177-235, 2001

CARES, J. E.; HUANG, S. P. Soil nematodes. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNALL, D. E. (Ed.). **A handbook of tropical soil biology: sampling and characterization of below-ground biodiversity**. London: Earthscan, 2008. p. 97-106.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77 p.

DECRAEMER, W. **The family Trichodoridae: stubby root and virus vector nematodes**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 360 p.

EDWARD, J. C.; MISRA, S. L. **An introduction to plant nematology**. Allahabad: Central Book Depot, 1974. 82 p.

EISENBACK, J. D. Morphology and systematics. In: BARTELS, J. M. (Ed.). **Plant and nematode interactions**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p. 37-63, 1998.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematóides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo, SP: Ceres, 1995. p. 168-201. v. 1.

FORTUNER, R. Methods for collection and preparation of nematodes. Part 1. Field sampling and preparation of nematodes for optic microscopy. In: NICKLE, W.R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York, NY: Marcel Dekker, 1991, p. 75-87.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; OLIVEIRA, R. D. L. Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. cap.11, p. 253-291.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 84 p.

GOODELL, P. B. Soil sampling and processing for detection and quantification of nematode populations for ecological studies. In: FRECKMAN, D. W. (Ed.). **Nematodes in soil ecosystems**. Austin: University of Texas Press, 1982. p. 178-198.

GOODEY, J. B. **Soil and freshwater nematodes**. London: Methuen, 1963. 544 p.

GOULART, A. M. C. **Diversidade de nematóides em áreas de vegetação nativa e cultivada em São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil**. 2002. 151 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

- GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematóides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008 (Embrapa Cerrados. Documentos, 219) (No prelo).
- GOULART, A. M. C.; FERRAZ, L. C. C. B. Amostragem em estudo de biodiversidade de nematóides em cerrado preservado ou substituído por culturas agrícolas. **Fitopatologia Brasileira**, Supl., p. 163, 2005.
- GOULART, A. M. C.; MONTEIRO, A. R.; FERRAZ, L. C. C. B. Comunidades de nematóides em Cerrado com vegetação original preservada ou substituída por culturas: diversidade taxionômica. **Nematologia Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 129-137, 2003.
- GOULART, A. M. C.; MARCHÃO, R. L.; VILELA, L.; SANTOS JUNIOR, J. D. G.; SÁ, M. A. C. Diversidade de nematóides em um latossolo vermelho sob sistemas de integração lavoura-pecuária no Cerrado. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília, DF. **Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais: anais...** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008a. 1 CD-ROM.
- GOULART, A. M. C.; SÁ, M.A.C.; SANTOS JUNIOR, J.D.G.; FERREIRA, E.A.B.; RESCK, D.V.S. Diversidade de nematóides em solo sob Cerrado preservado ou submetido a sistemas de manejo. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília, DF. **Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais: anais...** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008b. 1 CD-ROM.
- HEYNS, J. **A guide to the plant and soil nematodes of South Africa**. Cape Town: A. A. Balkema, 1971. 232 p.
- HOOPER, D. J. Handling, fixing, staining and moulting nematodes. In: SOUTHEY, J. F. (Ed.). **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1986. p. 59-80.
- HUGOT, J. P.; BAUJARD, D.; MORAND, S. Biodiversity in helminthes and nematodes as a field study: an overview. **Nematology**, v. 3, p. 199-208, 2001.
- HUNT, D.J. **Aphelenchida, longidoridae and trichodoridae: their systematics and bionomics**. Wallingford: CAB International, 1993. 352 p.
- JAIRAJPURI, M. S.; AHMAD, W. **Dorylaimida: free-living, predaceous and plant-parasitic nematodes**. Leiden: E. J. Brill, 1992. 458 p.
- KHAN, M. R. **Plant nematodes: methodology, morphology, systematics, biology and ecology**. Enfield: Science Publishers, 2008. 360 p.
- KREBS, C. J. **Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance**. New York: Harper Collins College, 1994. 801 p.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

KHAN, M. R. **Plant nematodes: methodology, morphology, systematics, biology and ecology**. Enfield: Science Publishers, 2008. 360 p.

KIRJANOVA, E. S.; KRALL, E. I. **Parasitic nematodes of plants and their control measures**. New Delhi: Indian National Scientific Documentation Centre, 1977. 913 p.

KRALL, E. L. **Root parasitic nematodes: family hoplolaimidae**. Leiden: E. J. Brill, 1990. 580 p.

LIMA, R. D. Sintomatologia e diagnose de nematóides. **Informe Agropecuário**, v. 16, n. 172, p. 17-22, 1992.

LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. 871 p.

MAGGENTI, A. **General nematology**. New York, NY: Springer Verlag, 1981. 372 p.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. London: Croom Helm, 1988. 179 p.

MATTOS, J. K. A. **Caracterização das comunidades de nematóides em oito sistemas de uso da terra nos cerrados do Brasil Central**. Brasília, DF. 1999. 113 f. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília.

MAY, W. F.; MULLIN, P. G. **Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera**. New York, NY: Cornell University Press, 1996. 277 p.

MCSORLEY, R. Extraction of nematodes and sampling methods. In: BROWN, R.H.; KERRY, B.R. (Ed.). **Principles and practice of nematode control in crops**. Sydney: Academic Press, 1987. p. 13-46.

NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York, NY: Marcel Dekker, 1991, 1035 p.

NORTON, D. C. Aspects of geographical distribution. In: NORTON, D. C. **Ecology of plant-parasitic nematodes**. New York, NY: John Wiley, p. 1-15, 1978.

NORTON, D. C.; NIBLACK, T. L. Biology and ecology of nematodes. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 47-72.

PASCHOAL, A. D.; MONTEIRO, A. R.; FERRAZ, L. C. C. B.; MARICONI, F. A. M.; FLECHTMANN, C. H. W.; INOMOTO, M. M. **Animais de interesse agrícola, veterinário e medico: apontamentos práticos de zoologia e parasitologia**. Piracicaba, SP: Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz", 1995. 224 p.

PLANTIO DIRETO. Passo Fundo, n. 99, maio/junho de 2007. 36 p.

SCHMITT, D. P.; BARKER, K. R. Damage and reproductive potentials of *Pratylenchus brachyurus* and *P. penetrans* on soybean. **Journal of Nematology**, v. 13, p. 327-332, 1981.

SHURTLEFF, M. C.; AVERRE III, C. W. **Diagnosing plant diseases caused by nematodes**. Minnesota: APS Press, 2000. 187 p.

SIDDIQI, M. R. **Tylenchida: parasites of plants and insects**. Wallingford: CABI, 2000. 833 p.

SOUTHEY, J. F. Principles of sampling for nematodes. In: SOUTHEY, J. F. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986. p. 1-4.

SOUTHWOOD, T. R. E. **Ecological methods**. London: Methuen, 1968. 391 p.

THORNE, G. **Principles of nematology**. New York: McGraw-Hill, 1961. 553 p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 1993. 372 p.

TIHOHOD, D. **Guia prático de identificação de fitonematóides**. Jaboticabal, SP: FCAV; FAPESP, 1997. 246 p.

TOMAZINI, M. D. **Caracterização das comunidades de nematóides em mata nativa e áreas contíguas submetidas a diferentes tipos de uso agrícola em Piracicaba (SP)**. Piracicaba, 2008. 67 f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

WEISCHER, B.; BROWN, D. J. F. **Conhecendo os nematóides: nematologia geral**. Sofia: Pensoft Publishers, 2001. 209 p.

YEATES, G. W.; COLEMAN, D.C. Role of nematodes in decomposition. In: FRECKMAN, D. W. (Ed.). **Nematodes in soil ecosystems**. Austin: University of Texas Press, 1982. p. 55-80.

Nematological Analysis: importance and general principles

Abstract

Nematodes can damage many crops. In order to manage these organisms, avoiding losses in agriculture, it is necessary to collect soil and root samples in the field and send them as soon as possible to a nematology laboratory. Sampling for nematode analysis should be carefully done, according to scientific recommendations. The analysis of nematodes is a specialized and complex laboratory process, requiring appropriate equipment and materials, as well as trained and qualified personnel, including a nematologist and assistants. The main steps of the nematological analysis, from the stage that occurs in the field, are: sample collection; packaging, identification and transport of samples; receipt of samples in the laboratory; nematode extraction from samples; fixation; quantification (counting) of nematodes; slides preparation; taxonomic identifications of nematodes.

Index terms: nematodes, plant parasitic nematodes, nematological analysis, diagnosis, damages, management.

Embrapa

Cerrados

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

