

# NEMATÓIDES FITOPARASITOS ( 1 )

[ AULA PRÁTICA # 6 ]

## COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS NEMATOLÓGICAS

Profissionais da Engenharia Agrônômica e Eng. Florestal devem estar preparados, em seu cotidiano, para se defrontar com problemas de natureza fitossanitária devidos a nematóides. Atualmente, a procura por técnicos da parte de agricultores interessados em solucionar problemas causados por nematóides em suas áreas de produção intensificou-se muito e, portanto, conhecer-se os procedimentos usuais em tais casos passou a ser não só útil como necessário. Nesta aula, serão tratados justamente tópicos que dizem respeito às medidas que um engenheiro agrônomo ou engenheiro florestal devem tomar quando consultados sobre a possibilidade de danos e perdas observados em certa cultura, anual ou perene, terem causa nematológica.

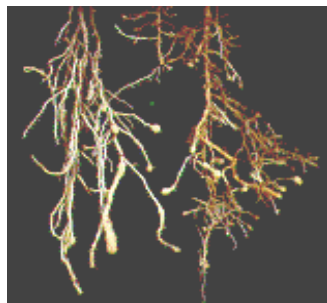
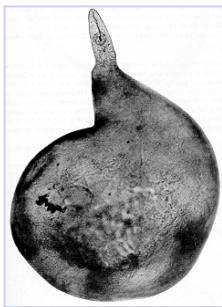
### Sintomas e Sinais

Ao examinar uma cultura com problemas sanitários possivelmente devidos a nematóides, o técnico deve, em primeiro lugar, atentar à existência de sintomas nas plantas que possam estar sendo causados por nematóides. Por **sintomas**, entendem-se condições anormais ou atípicas exibidas por plantas em seu estado geral, normalmente indicativas de algum tipo de interferência no crescimento e na produtividade.

No caso dos nematóides fitoparasitos, os sintomas costumam ser divididos em dois tipos: i) diretos: são os observados ou ocorrentes no órgão vegetal que está sendo atacado, ou seja, onde os nematóides estão vivendo e desenvolvendo sua ação parasitária. Como os nematóides, na grande maioria dos casos, atacam raízes, os sintomas diretos praticamente equivalem a sintomas "provocados nas raízes"; e ii) reflexos: aqueles verificados em outras partes da plantas que não nas raízes, ou seja, principalmente nos órgãos aéreos (caule, folhas, ramos, flores, frutos). São assim chamados porque no geral refletem alterações ou desarranjos observados na parte aérea da plantas que são meramente decorrentes de danos causados às raízes.

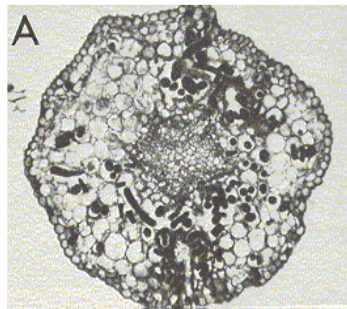
Os sintomas diretos causados por nematóides ditos sedentários diferem dos devidos aos nematóides migradores. Nematóides sedentários são os que, ao eclodir, apresentam forma esguia, alongada, e, portanto, são móveis, podendo migrar no solo em busca de

raízes de uma planta hospedeira; todavia, após penetrar nesta e estabelecer o parasitismo, o nematóide passa a ficar obeso e perde a capacidade de se movimentar, isto é, torna-se sedentário, fixo a aquele local da raiz. Ao atingir a fase adulta, as fêmeas de tais nematóides podem mostrar forma de saco, de maçã, de limão, de rim e outras. Tal grupo de nematóides causa a formação de células anormais (= tumores) junto ao cilindro central da raiz, que comprimem e obstruem parcialmente o xilema, dificultando bastante a absorção e o transporte de água e de nutrientes. Isso ocorre por exemplo com espécies dos gêneros *Heterodera* (nematóides de cistos) e *Rotylenchulus* (nematóides reniformes). Em um caso à parte, dos nematóides do gênero *Meloidogyne*, também sedentários, além desse tipo básico de dano, verifica-se proliferação incomum de células na região do córtex radicular (= hiperplasia) adjacente ao corpo do nematóide, resultando em uma área mais grossa da raiz naquele ponto. Tal engrossamento é referido como galha, sendo no geral bem visível a olho nu (em gramíneas, porém, como milho e sorgo, costumam ser diminutas e pouco visíveis).



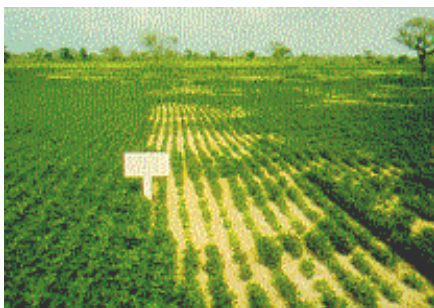
*Meloidogyne* (sedentário): fêmea obesa, em forma de saco (esq.); galhas incitadas em raízes de planta hospedeira (centro); galha radicular com fêmea obesa em seu interior (dir.)

Os nematóides migradores, diferentemente dos sedentários, conservam a forma esguia, alongada, do corpo por toda a vida e, por conseqüência, são sempre móveis. Na verdade, nos estádios juvenis e na fase adulta (fêmeas, principalmente), esses nematóides ficam entrando e saindo das raízes de suas plantas hospedeiras, em permanente migração. Penetram profundamente na região do córtex e, posicionando-se paralelamente ao cilindro central, passam a deslocar-se longitudinalmente, alimentando-se de muitas células. A alimentação em cada célula é relativamente rápida, passando logo o nematóide para outra. Tais células parasitadas, após pouco tempo, degeneram-se e morrem. Assim sendo, nos ataques mais severos por nematóides migradores, as raízes das plantas hospedeiras ficam com muitas áreas mortas, ou necrosadas, exibindo coloração pardo-escura ou negra. E com tal destruição de raízes, o volume do sistema radicular fica bem mais reduzido. Dois dos mais importantes gêneros de nematóides migradores são *Pratylenchus* (os 'nematóides das lesões radiculares') e *Radopholus* (os 'nematóides cavernícolas').



Secção transversal de uma raiz parasitada por exemplares de *Pratylenchus* sp., em migração junto ao cilindro central (esq.); raízes de bananeira necrosadas, atacadas por *Radopholus similis* (dir.).

Tanto os nematóides sedentários como os migradores provocam o aparecimento na parte aérea das plantas de sintomas reflexos que são decorrentes do mau funcionamento das raízes, pois tanto a absorção como o transporte de água e nutrientes é reduzido. Os sintomas reflexos mais comuns são murcha, amarelecimento (= clorose) e redução no porte das plantas. No geral, tais sintomas são mais visíveis em certos grupos de plantas dentro da cultura, chamados de "manchas" ou "reboleiras", o que é explicado pela distribuição irregular, heterogênea dos nematóides no solo.



Sintomas reflexos : reboleiras causadas por nematóides fitoparasitos (esq. e dir.); à direita, em soja, a mancha evidencia bem um grupo central de plantas mal crescidas e fortemente amarelecidas.

Há de se frisar que os sintomas diretos e reflexos citados não são unicamente provocados por nematóides fitoparasitos, podendo ter outras causas; em outras palavras, não são sintomas específicos ou exclusivos dos nematóides. Assim sendo, no campo, eles são muito importantes no sentido de reforçar a suspeita de que o problema local seja de fato devido a nematóides, mas a convicção plena, a certeza, só poderá ser obtida mediante a verificação dos chamados sinais. Por **sinais**, entende-se o parasito, partes de seu corpo ou mesmo produtos por ele formados, como os ovos por exemplo. Então o que está faltando é que se colem amostras de solo e raízes na área da cultura com sintomas para envio a laboratórios nematológicos especializados, onde se buscará comprovar a presença de

nematóides fitoparasitos no local e/ou de produtos por eles formados, como ovos. O encontro de tais sinais (do nematóide ou de seus ovos) será conclusivo, permitindo o estabelecimento da diagnose definitiva e a elaboração de recomendação técnica visando ao controle dos nematóides na área-problema.

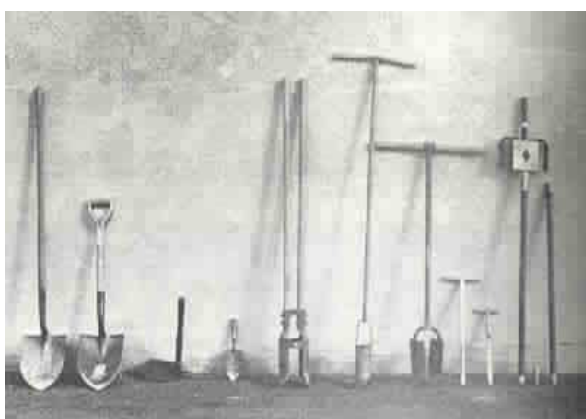
### **Coleta de Amostras Nematológicas**

Quando se suspeita fortemente que nematóides são a causa dos danos e perdas ocorrentes em uma dada área agrícola ou florestal, o passo inicial é a coleta de amostras de solo e/ou raízes (ambos, de preferência) no local para envio subsequente ao laboratório; são as chamadas amostras nematológicas. Há algumas recomendações práticas relativas à coleta dessas amostras:

- a)** evitar a coleta quando o solo estiver muito ressecado (durante estiagens) ou encharcado;
- b)** utilizar amostradores especiais de solo, denominados trados, sempre que possível, pois conferem maior precisão à coleta. Não se dispondo de trados, o uso de enxadão pode ser indicado em coletas de rotina, sem maiores problemas;
- c)** coletar o solo no perfil de 0 até 25-30 cm de profundidade, onde se concentra a maior parte do sistema radicular e, portanto, a maioria dos nematóides fitoparasitos. Em certos casos, de sistemas radiculares mais profundos, como com os eucaliptos, a profundidade de coleta deverá ser adaptada para 50 cm ou mais, eventualmente;
- d)** o número de amostras a ser coletado varia caso a caso e o bom senso do coletor deverá prevalecer nesse aspecto. Se a área a ser amostrada revelar-se homogênea quanto ao tipo de solo, às variedades ali cultivadas e outros aspectos básicos, uma única amostra composta será suficiente. Entende-se por amostra 'composta' aquela formada por várias - no geral de 5 a 20 - 'sub-amostras simples', totalizando de 0,5 a 1,0 kg de solo e cerca de 50 g de raízes. Se a área for heterogênea, com parte dela sendo de solo arenoso e parte de solo argiloso, devem ser tomadas uma amostra composta para cada uma delas, pois a textura do solo afeta muito a ocorrência de nematóides. Se na parte arenosa, por exemplo, forem cultivadas duas diferentes variedades da cultura (a cana-de-açúcar seria um bom exemplo), para cada uma delas deverá igualmente ser coletada uma amostra composta separada. Ainda, se na área houver declividade algo acentuada, tirar amostras compostas tanto da parte mais alta como da baixada. Para a coleta das várias sub-amostras simples (solo e raízes) que irão compor uma amostra composta, caminhar sempre em zigue-zague. Se houver reboleiras bem evidentes, será preferível coletar sub-amostras de plantas localizadas na periferia delas, evitando-se as plantas centrais;
- e)** acondicionar o solo e as raízes em sacos plásticos de parede resistente, identificando tais amostras externamente com pincel atômico ou colando etiqueta adesiva. A clara e correta identificação é essencial. Evitar a colocação de etiqueta de papel dentro da embalagem,

pois, com a umidade do solo, poderá borrar ou rasgar-se facilmente. Além do número da amostra, é fundamental o envio de uma série de informações relativas à área amostrada (nome do interessado, nome da propriedade, localização da propriedade, cultura instalada na área, variedade da cultura, culturas ali plantadas nos últimos 5 a 10 anos, práticas culturais adotadas, sintomas observados pelo interessado etc.), definidas segundo as instruções de cada laboratório;

**f)** remeter as amostras ao laboratório com a maior brevidade possível; se tiver de aguardar algum tempo antes de enviá-las, mantê-las dentro de recipientes de isopor em local bem fresco e sombreado, ou mesmo em geladeira (à 5-6°C) [nunca em *freezer* !].



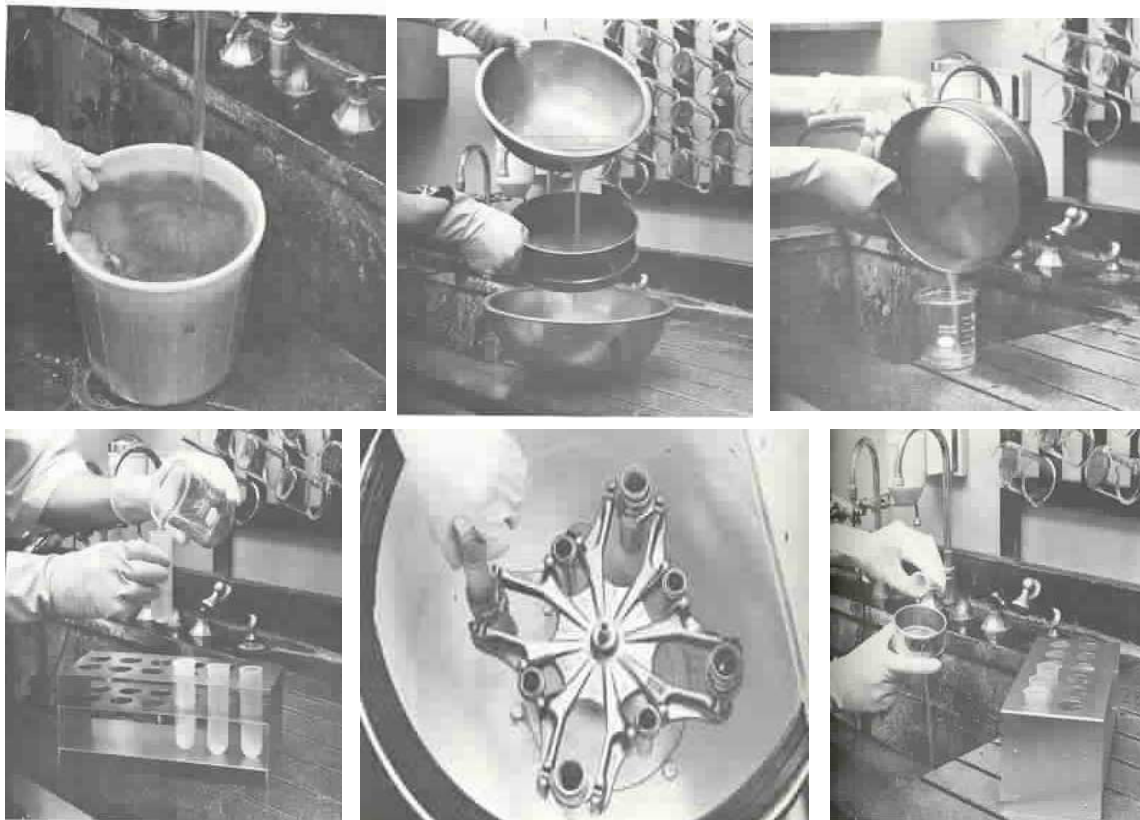
Trados e outros equipamentos úteis à coleta de amostras nematológicas (esq); sacos plásticos contendo solo e/ou raízes sendo mantidos em recipientes de isopor até a remessa ao laboratório (dir)

### **Extração e Identificação dos Nematóides**

No laboratório nematológico, para cada amostra, as raízes serão separadas do solo, pois o processamento em cada caso é diferente. A extração dos nematóides do solo hoje é feita, em praticamente todo o mundo, por um método chamado, de modo abreviado, de "Método de Jenkins" (ou "método do peneiramento e flutuação em centrífuga"). Tal técnica combina fases de peneiramento e centrifugação, permitindo a separação dos nematóides presentes na amostra da matéria orgânica e das frações arenosa e argilosa do solo.

Resumidamente, tem-se os seguintes passos. Primeiro, mistura-se bem o solo desfazendo eventuais torrões, usando luvas para cobrir as mãos. Separa-se o volume de solo a ser processado (no geral, entre 200 e 300 ml) e deposita-se no fundo de um balde plástico. Adiciona-se volume de água equivalente a dez vezes o volume de solo (dois a três litros). Agita-se fortemente e deixa-se descansar por 15 segundos. A fração mais pesada do solo (partículas de areia e argila) vai ao fundo e fica uma suspensão turva (parda ou pardo-avermelhada). Inclina-se o balde e filtra-se com cuidado essa suspensão através de duas peneiras granulométricas - a de número 20 sobreposta à de número 400 - evitando-se que o

material depositado no fundo chegue a ser arrastado. Pode-se proceder ao peneiramento em duas etapas também, primeiro pela número 20 e depois pela 400, o que é indicado no caso de solos mais argilosos. Na peneira 20, de malha mais larga, apenas ficam retidos resíduos grosseiros, como pedrinhas, sementes, restos de folhas etc.. A peneira 400, com malha muito mais estreita, vai reter a matéria orgânica, os nematóides (se presentes), outros organismos microscópicos (minhocas, artrópodes, estruturas de fungos micorrízicos) e uma fração residual de argila. Lava-se essa peneira com água e recupera-se todo esse material retido em um copo de vidro tipo béquer.



Etapas da extração pelo método de Jenkins: i) destorroamento e suspensão do solo em água no balde; ii) um dos dois peneiramentos; iii) recuperação do retido na peneira 400 em água; iv) transferência do peneirado ao tubo da centrífuga; v) colocação do tubo na cruzeta para a primeira centrifugação; vi) filtração final da solução de sacarose contendo os nematóides em peneira 500.

Na seqüência, esse líquido é transferido ao tubo de uma centrífuga e esta posta para funcionar por 5 minutos à velocidade de 1900-2000 giros. Após esse tempo, observa-se que a argila depositou no fundo do tubo arrastando consigo os nematóides, ali formando um sedimento; a matéria orgânica, muito leve, fica na superfície da água e, ao se descartar esse sobrenadante, é eliminada. Para completar o método, resta separar os nematóides da argila. Nesse sentido, adiciona-se ao tubo um certo volume de solução de sacarose de densidade

conhecida, igual a 1,15 (para preparar um litro de solução, basta colocar 750 ml de água e 400 g de açúcar refinado ou cristal em liquidificador e "bater" por 20 a 30 segundos). Essa densidade é pouco maior do que a densidade da maioria dos nematóides fitoparasitos (de 1,10 a 1,13) e bem menor que a da argila. Com isso, fazendo-se funcionar a centrífuga por um minuto a 1900-2000 giros, a argila irá novamente depositar-se no fundo, mas os nematóides não mais serão arrastados e permanecerão em suspensão na solução de sacarose. Bastará então verter essa solução através de uma peneira de número 500, de malha muito fina, sobre uma pia, sem permitir que o sedimento de argila do fundo do tubo seja arrastado; a solução açucarada atravessará e será descartada, ficando os nematóides retidos na peneira. Com uma pisseta, lava-se a peneira, recuperando-se os nematóides em água limpa. O material está pronto para ser examinado ao estereoscópio.

Essa técnica é eficiente, possibilitando extração de nematóides vivos e mortos, e rápida, completando-se o processamento de uma amostra em cerca de dez minutos. Daí a sua ampla e quase generalizada utilização atualmente nas clínicas nematológicas.

Após a extração, os nematóides são mortos pelo aquecimento gradual em água até 65-70°C e, em seguida, fixados em formalina 2 a 4%, podendo assim serem preservados por alguns meses em frascos de vidro sem problemas de contaminação por fungos.

No geral, pouco após a fixação, já se realizam as estimativas populacionais dos nematóides extraídos da amostra ao microscópio óptico, empregando-se para tanto lâminas especiais de contagem. Os níveis populacionais determinados para cada gênero e/ou espécie são anotados, bem como a quantidade de nematóides não parasitos de plantas (= vida livre), preenchendo-se assim uma tabela que irá servir de referência ao nematologista no momento de recomendar medidas de controle ao agricultor/silvicultor interessado.

Vê-se abaixo exemplo de ficha de resultados de análise nematológica de 3 amostras coletadas em área cultivada (cana-de-açúcar) com possíveis problemas nematológicos.

Número da amostra	<i>Meloidogyne</i>		<i>Pratylenchus</i>		<i>Helicotylenchus</i>		Nematóides de vida livre (solo)
	Solo	Raiz	Solo	Raiz	Solo	Raiz	
A - 03	1150	480	950	1230	140	20	3940
A - 04	3060	1300	180	60	80	--	2450
B - 01	110	30	4370	2660	440	130	1880

Espécies identificadas: *M. javanica* (todas as amostras); *P. brachyurus* (A03 e A04) e *P. zae* (B-01); *Helicotylenchus* sp. (todas as amostras); valores relativos a 200 ml de solo e 5 g de raízes.

Fique atento às explicações adicionais do professor sobre o assunto e, segundo as suas instruções, realize as atividades práticas previstas, individuais e/ou em grupo.