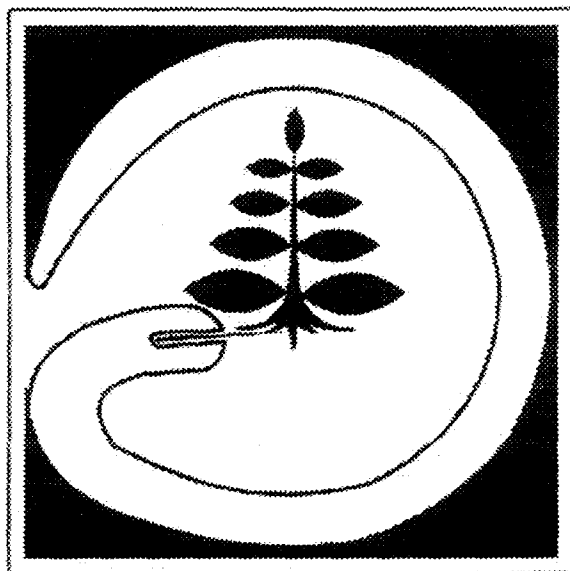


MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE NEMATOIDES DE
AMOSTRAS DE SOLO E/OU RAÍZES



**Sociedade Brasileira
de Nematologia**

Luiz Carlos C. B. Ferraz

Ailton R. Monteiro

Mário M. Inomoto

Extração

Serão aqui resumidamente descritos apenas os métodos mais empregados em laboratórios nematológicos atualmente. Há vários outros, alguns muito específicos, que poderão ser encontrados na literatura pertinente.

Amostras de Solo

1) Método de Jenkins

Muito utilizado em todo o mundo, é conhecido como “método de Jenkins (1964)”, sendo tecnicamente chamado de “método do peneiramento combinado a flutuação em centrífuga com solução de sacarose”. Os passos principais são os seguintes:

a) Misturar o solo da amostra, destorroando-o sempre que necessário; utilizar luvas para a cobertura e proteção das mãos. Separar o volume padronizado para extração no laboratório local (na Clínica Nematológica da ESALQ, equívale a 200 mL) e depositar no fundo de balde plástico;

b) Adicionar água equívale a oito a dez vezes o volume de amostra de solo utilizado. Também com luvas cobrindo as mãos, misturar bem o solo e a água, homogeneizando ao máximo a suspensão obtida. Eliminar eventuais torrões ou detritos remanescentes e agitar vigorosamente a suspensão;

c) Sem deixar descansar, passar a suspensão pela peneira número 20 (malha de 0,84 mm), para separar resíduos grosseiros, recebendo o volume filtrado em um segundo balde. Não permitir que o material sedimentado no fundo do balde seja arrastado e passe pela peneira. Em seguida, passar gradualmente o filtrado pela peneira número 400 (malha de 0,037 mm), sem deixar que muito líquido acumule nela. Novamente, evitar que o material sedimentado no fundo do balde seja arrastado e passe pela peneira. Com auxílio de pisseta, lavar a peneira 400, recuperando o material nela retido em água e transferindo-o para béquer de 250 mL;

(* : a critério do operador, pode-se realizar um único peneiramento, mantendo-se as duas peneiras citadas acopladas, com a 20 sobreposta à 400; isso exige certa experiência, de modo a prevenir-se eventual entupimento da peneira 400; no caso de análise de amostra que exija resultados bastante rigorosos, o segundo peneiramento poderá vir a ser repetido, aumentando a precisão).

d) Transferir o conteúdo do béquer para um ou dois tubos opostos de centrífuga, dependendo do volume de suspensão existente. Equilibrar rigorosamente os dois tubos e acionar a centrífuga. Fazer funcionar na faixa de 1800 a 2000 giros durante cinco (5) minutos; desligar e aguardar a total parada; eliminar o sobrenadante, removendo eventual camada de matéria orgânica (“espuma”) presente nos bordos do(s) tubo(s) com papel absorvente. Observar sedimento (no geral pardo-claro ou pardo-escuro) depositado no fundo do tubo;

e) Adicionar solução de sacarose de densidade 1,15 (400 g de açúcar em 750 mL de água “batidos” no liquidificador por 30 segundos perfazem 1 L dessa solução) ao(s) tubo(s), balanceando-os cuidadosamente. Agitar o conteúdo dos tubos, ressuspensando o sedimento do fundo e formando suspensão. Ligar a centrífuga fazendo funcionar por um (1) minuto, após estabilizar na faixa de 1800 a 2000 giros. Desligar e aguardar a total parada;

f) Retirar o(s) tubo(s) e verter o sobrenadante por peneira número 500 (malha de 0,025 mm), lavando-a em seguida com água para eliminar resíduos da solução açucarada. Com auxílio de

pisseta, recuperar o material retido na peneira em água e transferi-lo para recipiente de vidro, como siracusa ou placa de Petri, em que possa ser examinado ao estereoscópio.

Vantagens: a) boa eficiência na extração da maioria dos gêneros de fitonematóides; b) rapidez (uma amostra é processada em menos de dez minutos); c) permite tanto a extração de exemplares vivos (ativos) como já mortos (inativos).

Limitação: a restrição que pode ser apontada é de ordem econômica pois requer uso de centrífuga, que é equipamento relativamente caro; ademais, como esta costuma apresentar problemas técnicos com certa frequência, devido ao uso intensivo, é comum os laboratórios nematológicos contarem com duas centrífugas, e não apenas uma.

2) Método combinado do peneiramento e Baermann modificado

Muito usado no passado, ainda hoje é adotado por alguns laboratórios, de forma alternativa ou complementar ao método de Jenkins. Os passos iniciais, de a até c, são os mesmos já descritos para o método anterior. Desse ponto em diante, deve-se verter a suspensão obtida a partir da lavagem da peneira 400 através de um meio filtrante, como camada de algodão hidrófilo (ou outro material poroso resistente à passagem de água) apoiada sobre retalho de tela de plástico de 1,0 mm de malha. Partículas de solo residuais, matéria orgânica e nematóides ficarão retidos no algodão (ou em meio filtrante equivalente). Em seguida, tal conjunto deverá ser colocado sobre recipiente raso (siracusa, por exemplo) contendo água. Com leve pressão dos dedos nos bordos da tela plástica, força-se o contato entre a parte central do conjunto e a superfície da água, de modo a formar uma coluna ou filme contínuo. Deixar então o material em repouso durante 12 a 24 horas em local fresco e sombreado; muitos técnicos optam por mantê-lo no interior de caixas de isopor fechadas, conservadas em sala climatizada. Decorrido o período, remove-se o conjunto tela + meio filtrante e observa-se os nematóides extraídos no líquido da siracusa sob estereoscópio.

Vantagens: a) eficiência comparável à de outros métodos para a maioria dos gêneros de fitonematóides; b) não requer equipamentos de custo elevado.

Limitações: a) não oferece resultados imediatos, mas apenas após 12 ou, preferivelmente, 24 horas; b) apenas nematóides vivos (ativos) são extraídos ! c) no caso de muitas amostras para processamento a curto prazo, pode ocorrer problema de falta de espaço no laboratório.

Amostras de raízes

Para a extração de exemplares presentes nas raízes, os métodos mais usados são derivados daqueles desenvolvidos originalmente para amostras de solo e, em função disso, mostram certa semelhança.

1) Método do liquidificador, peneiramento e flutuação em centrífuga com solução de sacarose

Também conhecido como “método de Coolen & D’Herde (1972)”, assemelha-se bastante ao “método de Jenkins”.

a) Lavar as radículas em água corrente e cortá-las em pedaços de 1 cm de comprimento. Misturar bem, separar amostra com o peso tido como padrão pelo laboratório (5 g na Clínica Nematológica da ESALQ) e triturar em liquidificador contendo 250 mL de água por 30 a 45 segundos;

- b) Verter a suspensão resultante através das peneiras 20 e 400, que poderão estar acopladas. Recuperar o retido na peneira 400 (nematóides + resíduos vegetais) em água com auxílio de pisseta, transferindo-o para béquer de 250 mL;
- c) Colocar a suspensão em tubo de centrífuga (pode-se dividir em dois tubos, se houver muito líquido), tomando-se o cuidado de adicionar 1cm³ de caulim (argila branca). Agitar bem. Colocar a centrífuga em funcionamento por cinco (5) minutos na faixa de 1800 a 2000 giros. Desligar e aguardar parada total. Eliminar o sobrenadante, limpando também os bordos do tubo com papel absorvente. Observar o sedimento de cor clara depositado no fundo do tubo;
- d) Adicionar solução de sacarose de densidade 1,15 ao(s) tubo(s), balanceando-os cuidadosamente. Agitar o conteúdo dos tubos, ressuspensando o sedimento do fundo e formando suspensão. Ligar a centrífuga fazendo funcionar por um (1) minuto, após estabilizar na faixa de 1800 a 2000 giros. Desligar e aguardar a total parada;
- e) Retirar rapidamente o(s) tubo(s) e verter o sobrenadante por peneira número 500, lavando-a em seguida com água para eliminar resíduos da solução açucarada. Com auxílio de pisseta, recuperar o material retido na peneira em água e transferi-lo para recipiente de vidro, como siracusa ou placa de Petri, em que possa ser examinado ao estereoscópio.

2) Método do liquidificador e peneiramento combinado com o Baermann modificado

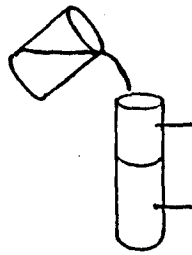
Muito semelhante ao “método do peneiramento combinado com o Baermann modificado”, descrito para amostras de solo. A diferença está no fato de que as radículas necessitam ser lavadas, cortadas em pedaços de 1 cm de comprimento, misturadas e pesadas para formar a amostra padrão, que será triturada em liquidificador contendo 250 mL de água por 30 a 45 segundos. A suspensão obtida será então submetida aos passos subseqüentes já descritos anteriormente.

Literatura citada ou útil para consulta

- Coolen, W. A. & C. J. D’Herde, 1972. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue.** Ghent State Agriculture Research Centre.
- Jenkins, W. R., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, **48**: 692.
- Southey, J. F., 1986. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes.** HMSO, London, Reference Book # 402, 202 p.
- Tihohod, D., 1993. **Nematologia Agrícola Aplicada.** FUNEP, Jaboticabal, SP, 372 p.

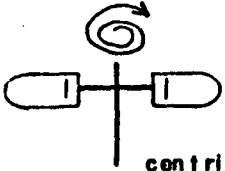


becker + 40 ml com suspensão de nematóides obtido do mg todo do Funil Baermann ou do peneiramento

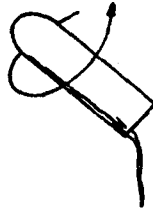


tubo da centrifuga

solo + H₂O + nematóides



centrifugar 1750 rpm por 4 minutos

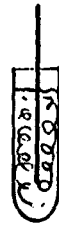


desprezar o sobrenadante

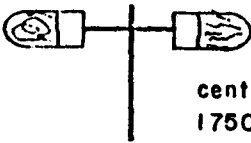


sacarose

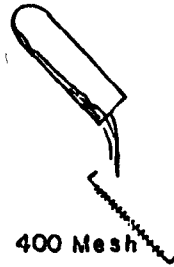
adicionar solução sacarose (d = 1,15)



agitar

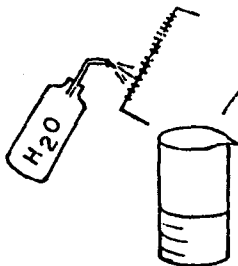


centrifugar 1750 rpm por 1 minuto



peneira r sobrenadante, lavar com H₂O

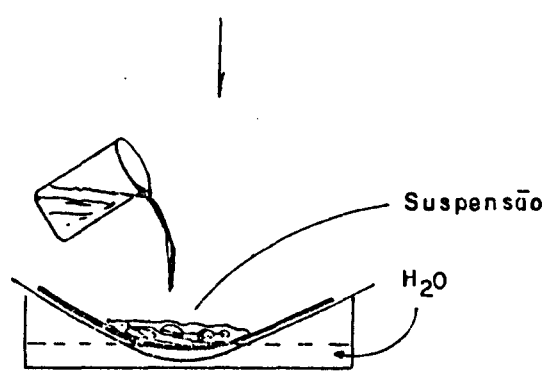
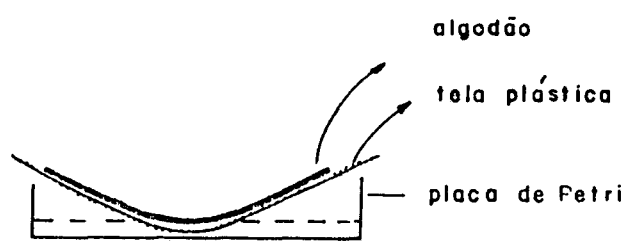
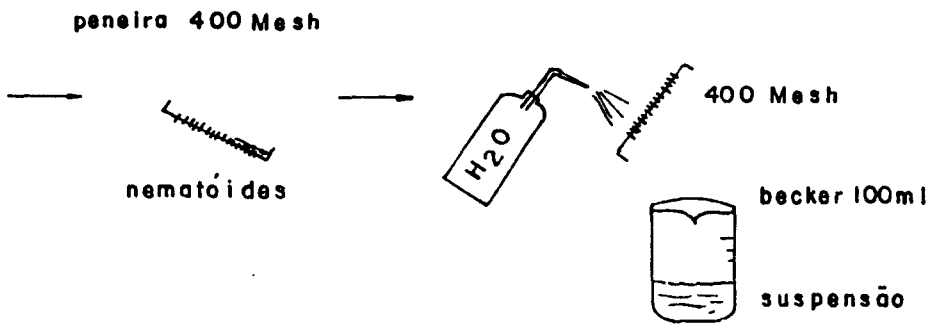
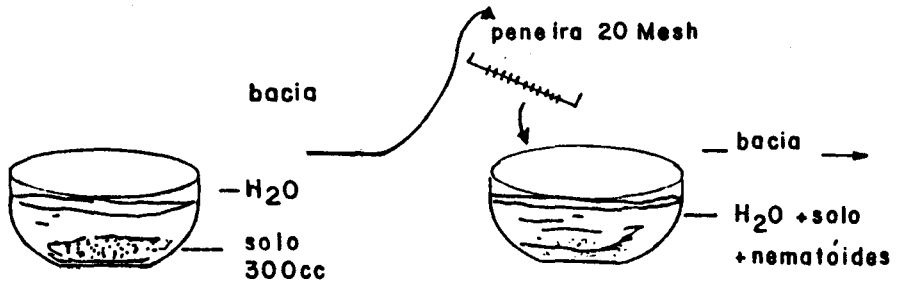
400 Mesh



recolhar em becker 20ml da suspensão

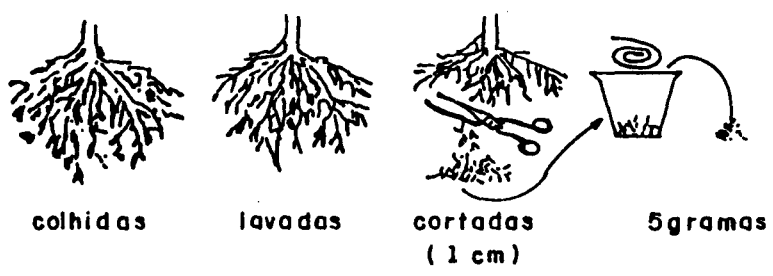
levar para identificação e contagem sob microscópio com o auxílio da lâmina de contagem.

adapt. de TIHOHOD (1989)

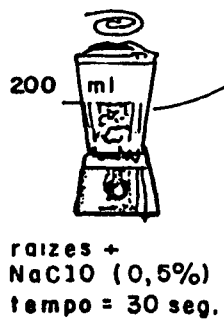


adapt. de
TIHOHOD
(1989)

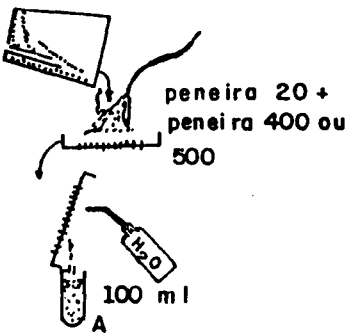
1- Raízes infestadas por *Meloidogyne* spp. ou outro nematóide



2- Triturar

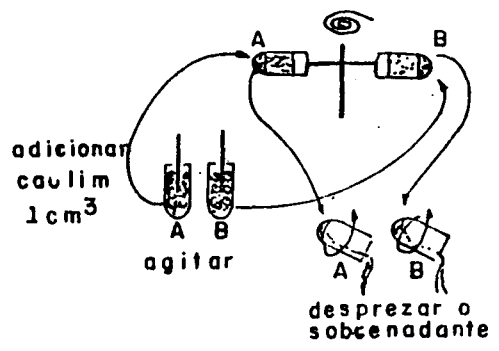


3- Peneirar

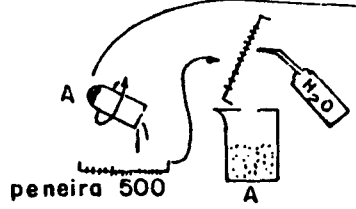
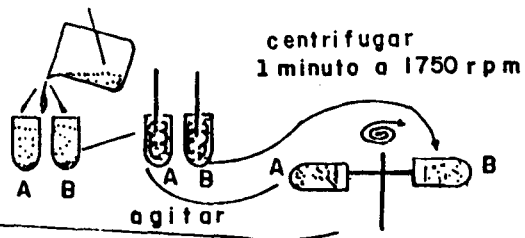


4- Centrifugar

4 ou 5 minutos a 1750 rpm



5- Adicionar solução de sacarose (densidade = 1,15)



6. Peneirar sobrenadante, lavar e recolher em copo graduado

adapt. de TIHOCHOD (1989)