

*Recomendações Técnicas para Amostragem,  
Processamento de Amostras e Emissão de Laudos*

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA**

**Setembro de 2019**



## SUMÁRIO

➤	Preâmbulo .....	1
➤	Recomendações para amostragem .....	2
➤	Processamento de amostras de solo e raízes	
	* Método de Jenkins (1964) .....	3
	* Método do Funil de Baermann (1917) .....	5
	* Método do Funil de Baermann otimizado .....	6
	* Método de Coolen & D'Herde (1972) .....	8
	* Método de Boneti & Ferraz (1981) .....	9
➤	Extração de cistos de <i>Heterodera glycines</i> de solo seco (Machado & Silva, 2019).....	9
➤	Extração de cistos de <i>H. glycines</i> de solo úmido (Machado & Silva, 2019).....	11
➤	Emissão de laudos nematológicos .....	11
➤	Referências bibliográficas .....	13

## PREÂMBULO

Por ocasião do 35º Congresso Brasileiro de Nematologia, a assembleia geral da Sociedade Brasileira de Nematologia instituiu uma comissão encarregada de selecionar técnicas e procedimentos a serem sugeridos a todos os laboratórios que realizam análises nematológicas no Brasil. Tais técnicas deveriam cobrir as atividades de amostragem, processamento de amostras e emissão de laudos nematológicos.

As técnicas e procedimentos ora apresentados baseiam-se nas publicações científicas originais, que são de ampla aceitação na comunidade científica internacional. Naturalmente, tais técnicas e procedimentos podem ser adaptados a circunstâncias específicas ou serem aprimorados, mas sempre mediante estudos empíricos que devem ser submetidos ao crivo da comunidade científica e apresentados em publicações científicas.



## RECOMENDAÇÕES PARA AMOSTRAGEM

- Em culturas anuais, a melhor **época de amostragem** é o período de florescimento, por volta dos 60 dias após a germinação. Em culturas perenes, a melhor época de amostragem é o período de maior crescimento vegetativo e emissão de raízes, que ocorre de 40 a 50 dias após o início do período das chuvas.
- Quando, na área amostrada, houver a **presença de reboleiras**, deve-se coletar as amostras nos bordos das mesmas, nunca no centro. Na ausência de reboleiras, deve-se coletar as amostras em área total da lavoura ou talhão, de maneira aleatória.
- As amostras que serão processadas devem ser compostas por **subamostras**, coletadas em talhões ou glebas com maior uniformidade, de acordo com o histórico da área.
- As **subamostras** devem ser coletadas em ziguezague na área, com auxílio de ferramentas de coleta de solo. Sugere-se a coleta de, pelo menos, 20 subamostras por talhão com até 100 hectares.
- Deve-se coletar as subamostras de solo e raízes (ou outros órgãos vegetais, dependendo da espécie de nematoide) na **profundidade de 0 a 20 cm**, com umidade natural, evitando solos encharcados ou muito secos. Preferencialmente, coletar as raízes mais finas ou radicelas, e solo da rizosfera das plantas.
- As subamostras coletadas deverão somar uma **quantidade mínima** de 500 ml de solo e 20 gramas de raízes, que serão enviados ao laboratório para processamento.
- Para a coleta de amostras deve-se usar sempre **sacos plásticos**, nunca de papel. No fundo do saco plástico, coloque um pouco do solo. A seguir, acrescenta-se as raízes, e completa-se o volume com o solo. Desta forma se evitará o ressecamento das raízes. **Não se deve** enviar ao laboratório amostra composta apenas por raízes, mesmo que o objetivo seja apenas a análise das raízes. Isto causará o ressecamento das raízes e comprometerá o resultado da análise.



- **Identifique** corretamente a amostra, anotando-se informações como nome do produtor, nome da propriedade, talhão, espécie de planta, cultivar, data de coleta etc.
- Envie as amostras o **mais rápido possível** ao laboratório, em caixas de isopor, para evitar o aquecimento das mesmas. Caso não seja possível enviar as amostras no mesmo dia da coleta, armazene em sala climatizada com temperatura amena ou em geladeira, na parte de baixo (nunca em congeladores/freezers). Isto permitirá armazenar as amostras por um período de até 4 a 5 dias, sem prejuízos às amostras.

## PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SOLO E RAÍZES

### 1) Método de Jenkins (1964), com modificações

- a) Separar o solo das raízes e homogeneizá-lo com as mãos, destorroando quando necessário, para posterior retirada de alíquota de 100 a 250 cm<sup>3</sup> para processamento.
- b) Em um balde, adicionar a alíquota de solo e adicionar 4 litros de água, misturando-se bem.
- c) A suspensão de solo deve ser passada por peneira de 20 *mesh* acoplada sobre outra de 400 ou 500 *mesh*. Descartar o sedimento restante no fundo do balde e as impurezas retidas na peneira de 20 *mesh*. Os nematoides retidos na peneira de 400 ou 500 *mesh* devem ser transferidos para um tubo de centrífuga até atingir o volume de 2/4 a 3/4 do total, com auxílio de uma pisseta com água.
- d) Os tubos devem ser balanceados antes da centrifugação.
- e) Centrifugar durante 5 minutos a 550 G. Para atingir esse valor, medir o raio do rotor da centrífuga (Figura 1) e usar as fórmulas abaixo para obter as rotações por minuto (rpm) necessárias. Após a centrifugação, descartar o sobrenadante de cada tubo. Nas bordas do tubo de ensaio podem ficar retidos resíduos de matéria orgânica e espuma, que também devem ser descartados.



**Figura 1: Medição do raio do rotor da centrífuga para cálculo do número de rotações por minuto**

O raio e angulação do rotor interferem na relação rpm/G. Para o cálculo do número de rotações por minuto, utilizar as seguintes fórmulas:

$$n = 299 \sqrt{RFC/r} \quad \text{ou} \quad RCF = 1,12 \cdot r \cdot \left(\frac{n}{1000}\right)^2$$

Onde **n = rpm**, **r = raio do rotor da centrífuga** (medido a partir do fundo do tubo) e **RCF = força centrífuga relativa ou força G**.

Usar **cm** para a primeira fórmula e **mm** para a segunda fórmula.

A centrífuga deve ser calibrada periodicamente para se evitar erros no processamento das amostras.



f) Adicionar uma solução de sacarose (densidade ajustada para 1,15 a 1,18, vide tabela abaixo), completando o volume do tubo da centrífuga até atingir o volume de 2/4 a 3/4 do total. Em seguida, balancear os tubos e centrifugar na mesma rotação anterior, por 1 minuto.

Densidade desejada	Quantidade de açúcar cristal (em gramas)	Adição de água
1,15	401	Completar volume para 1000 ml
1,18	484	Completar volume para 1000 ml

g) Após a centrifugação, o conteúdo sobrenadante deve ser vertido em uma peneira de 500 *mesh* e lavado cuidadosamente para eliminar a solução de sacarose.

h) Verter a suspensão em recipiente e aguardar, no mínimo, 1 hora para realizar a quantificação da amostra.

i) Os nematoides extraídos podem ser visualizados imediatamente ou armazenados após morte (aquecimento a 60° C em banho-maria) e fixação (adição de 1 ml de formalina a 4% - opcional).

## 2) Método do Funil de Baermann (1917)

a) Colocar o funil no suporte (Figura 2) e enchê-lo com água até chegar a cerca de 1 cm abaixo do aro. Tomar cuidado para evitar a formação de bolhas de ar. Certificar-se que o clipe (presilha) feche bem e que a água não esteja vazando pelo tubo de borracha.

b) No caso de processamento de solo, colocar uma alíquota de 50 cm<sup>3</sup> da amostra no funil, de modo que fique totalmente submersa pela água.



c) Após um período de 16 a 72 horas, a suspensão de nematoides pode ser coletada, abrindo-se o clipe do tubo de borracha.



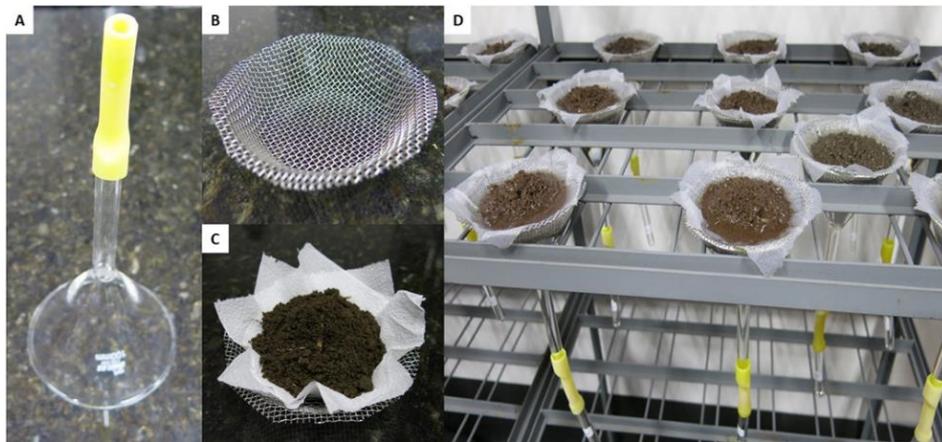
**Figura 2: Diagrama representando o funil de Baermann para extração de nematoides**

### **3) Método do Funil de Baermann otimizado**

a) Depositar a amostra de solo ou substrato ( $50 \text{ cm}^3$ ) em papel absorvente montado sobre a tela de aço (Figura 3). Sugere-se a utilização de duas folhas de papel higiênico folha simples ( $10 \times 10 \text{ cm}$ ), sobrepostas diagonalmente.



b) Depositar a peneira com a amostra sobre o aparato formado pelo funil, com o tubo de ensaio encaixado, preenchido com solução de cloreto de cálcio (CaCl) a 0,0025 M, até 0,5 cm abaixo da borda do funil. A amostra deve ficar parcialmente submersa na solução de CaCl, permitindo a movimentação dos nematoides e sua posterior migração para o tubo de ensaio.



**Figura 3: Adaptações feitas no método do funil de Baermann para extração de nematoides de amostras de solo. A: funil de vidro com mangueira de látex; B: tela de aço inox, moldada para encaixe no funil; C: amostra de solo depositada sobre duas folhas de papel absorvente sobrepostas; D: funil de Baermann otimizado montado em estante**

c) Após 48 horas, o conjunto da peneira deve ser retirado e o conteúdo, descartado. O funil deve ser cuidadosamente removido da estante e o tubo de ensaio retirado da base de borracha, descartando-se a solução do funil.



#### 4) Método de Coolen & D'Herde (1972)

- a) Separar o solo das raízes. As raízes deverão ser homogeneizadas com as mãos para processamento.
- b) Lavar e cortar as raízes em pedaços de cerca de 1 cm de comprimento.
- c) Triturar as raízes em liquidificador de, pelo menos, 300 W de potência, com água de torneira, por 1 minuto. Para extração de ovos de espécies de nematoides que formam massas de ovos gelatinosas externas, como *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis* e *Tylenchulus semipenetrans*, recomenda-se a adição de hipoclorito de sódio a 0,5% na solução para trituração das raízes no liquidificador. O hipoclorito de sódio dissolverá as massas de ovos, aumentando a eficiência de extração de ovos.
- d) Verter a suspensão sobre um conjunto de peneiras de 20 *mesh* sobreposta a outra de 500 *mesh*. Na peneira de 20 *mesh* ficarão retidas todas as impurezas, que devem ser descartadas. Recolher a suspensão retida na peneira de 500 *mesh* em tubo de centrífuga até atingir o volume de 2/4 a 3/4 do total com auxílio de pisseta com água.
- e) Adicionar em cada tubo de ensaio 1 cm<sup>3</sup> de caolin (pó de cerâmica), misturando completamente.
- f) Os tubos de ensaio devem ser balanceados e acomodados na centrífuga.
- g) Centrifugar durante 5 minutos a 550 G (verificar na página 4 como calcular este valor).
- h) Retirar os tubos de ensaio e descartar o sobrenadante cuidadosamente. Nas bordas do tubo podem ficar resíduos de matéria orgânica e espuma, que devem ser limpos com papel absorvente.
- i) Adicionar solução de sacarose com densidade de 1,15 a 1,18 (verificar na página 5 como preparar), completando o volume até atingir o volume de 2/4 a 3/4 do total. Em seguida, balancear os tubos da centrífuga e centrifugar por 1 minuto, na mesma rotação.



- j) O sobrenadante deve ser vertido em peneira de 500 *mesh*, lavando-se cuidadosamente para retirar o excesso de sacarose.
- k) Verter a suspensão em recipiente e aguardar no mínimo 1 hora para realizar a quantificação da amostra.
- l) Os nematoides extraídos podem ser visualizados imediatamente ou armazenados após morte (aquecimento a 60 °C em banho-maria) e fixação (adição de 1 ml de formalina a 4% - opcional).

### **5) Método de Boneti & Ferraz (1981) (para extração de ovos de *Meloidogyne* spp. de raízes)**

- a) Cortar as raízes em pedaços de cerca de 1,0 cm de comprimento.
- b) Triturar as raízes em liquidificador (recomendado: 300 W de potência) por 20 segundos a 1 minuto [dependendo da lignificação (“dureza”) da raiz], com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, em água.
- c) Verter a suspensão obtida em peneira de 200 ou 230 *mesh* acoplada sobre outra de 500 *mesh*. Lavar abundantemente com água de torneira e recolher os ovos retidos na peneira de 500 *mesh* com auxílio de pisseta com água.

### **6) Extração de cistos de *Heterodera glycines* de solo seco (flotação seguida de peneiramento) (Machado & Silva, 2019)**

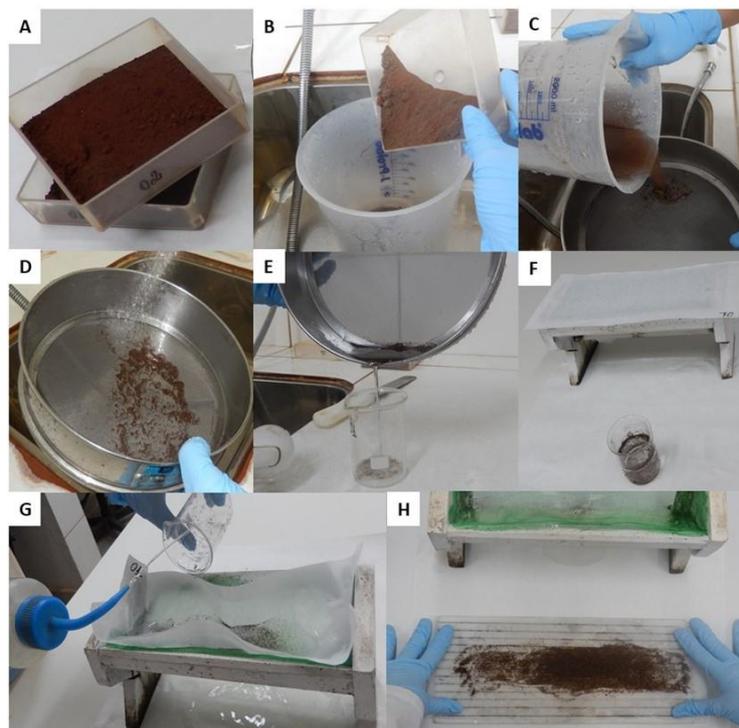
- a) Homogeneizar a amostra, separando-se uma alíquota de 100 cm<sup>3</sup>, que deve ser seca à sombra por 24 a 48 horas.



b) Utilizando-se béquer de 2 litros, acrescentar a amostra seca, adicionar água até o volume de 1800 ml e homogeneizar a suspensão.

c) Agitar circularmente a suspensão, de maneira vigorosa. Verter lentamente a suspensão sobre conjunto de peneiras de 25 *mesh* sobre outra de 100 *mesh* (opcionalmente, 20 sobre 60), repetindo esse processo de agitação e peneiramento por três vezes.

d) Os cistos assim extraídos poderão ser observados diretamente na suspensão, sob estereoscópio, ou em papel filtro montado sobre calha de recolhimento (Figura 4).



**Figura 4: Procedimentos para extração de cistos de *Heterodera glycines* a partir de amostra de solo seco. A: amostra de solo seco; B: mistura da amostra com água, em béquer; C: peneiramento da suspensão; D: lavagem da amostra; E: recolhimento da suspensão em béquer com auxílio de piseta com água; F: amostra recolhida, pronta para ser depositada em papel filtro montado em calha de recolhimento; G: aplicação da suspensão sobre o papel filtro, em calha; H: papel filtro com cistos e resíduos da amostra sobre placa de acrílico riscada para contagem**



## **7) Extração de cistos de *Heterodera glycines* de solo úmido (flotação seguida de peneiramento) (Machado & Silva, 2019)**

- a) Homogeneizar a amostra, separando-se uma alíquota de 100 cm<sup>3</sup>.
- b) Utilizando um balde de 10 litros, acrescentar a amostra, adicionar água até o volume de 5 litros e homogeneizar a suspensão.
- c) Agitar circularmente de maneira vigorosa e verter imediatamente a suspensão, evitando-se a decantação dos cistos, sobre um conjunto de peneiras, de 20 *mesh* sobre 100 *mesh*.
- d) Os cistos assim extraídos poderão ser observados sob estereoscópio diretamente na suspensão ou em papel de filtro montado sobre calha de recolhimento.

## **EMISSÃO DE LAUDOS**

A Sociedade Brasileira de Nematologia salienta a importância de que o responsável pela emissão do laudo seja um profissional com formação em Nematologia. A correta identificação taxonômica dos nematoides presentes na amostra é essencial para as decisões referentes ao manejo dos fitonematooides presentes nas lavouras.

Como profissional com formação adequada em Nematologia entende-se aquele que tenha realizado seu curso de mestrado ou doutorado com dissertação/tese em Nematologia, ou ainda graduado com experiência em Nematologia, comprovada por estágio ou iniciação científica na área. Em todos os casos, é importante que o profissional tenha treinamento em taxonomia, devido às peculiaridades e dificuldades inerentes à identificação de gêneros e espécies de nematoides.

A organização do laudo deve ficar a critério de cada laboratório. Entretanto, as informações contidas no modelo abaixo são **essenciais**, pois permitem a padronização e comparação de resultados emitidos por diferentes laboratórios.



### LOGOMARCA DO LABORATÓRIO

Nome do solicitante:

E-mail ou telefone de contato:

Nome do produtor agrícola (se diferente do solicitante):

Município:

Cultura/cultivar:

Data da coleta:

Data da entrada:

Material analisado: (solo ou raiz)

Quantidade de raiz ou solo analisado:

Identificação da amostra	Solo <sup>1</sup>		Raiz <sup>2</sup>	
	Espécie	Quantidade por cm <sup>3</sup>	Espécie	Quantidade por grama
X	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	2.352	<i>Pratylenchus brachyurus</i>	79
			Ovos	98
Y	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	87	<i>Pratylenchus brachyurus</i>	08
	<i>Pratylenchus brachyurus</i>	04	Ovos	66
	<i>Helicotylenchus dihystera</i>	02		
Z	Negativo	---	<i>Helicotylenchus dihystera</i>	14
			Ovos	476

<sup>1,2</sup> Indicar os métodos utilizados



Independente da quantidade de material processado, o laudo deve expressar as quantidades de nematoides **nas unidades sugeridas na tabela (cm<sup>3</sup> e gramas)**. Isto permitirá uma padronização entre os laboratórios.

A classificação do nível populacional dos nematoides em alto, médio ou baixo é opcional, uma vez que tal definição depende de situações particulares de cada região brasileira, e até mesmo de cada cultura. Não há, na literatura, informação consensual que se aplique a todas as circunstâncias, cabendo a cada laboratório a decisão de usar a classificação alto/médio/baixo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BAERMANN, G. Eine einfache method zur auffindung von ankvlostomum (Nematoden) larven in erdproben. Ned. Indie, 57: 131-137, 1917.

BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, v.6, p. 553, 1981.

COOLEN, W. A. & D'HERDE, C.J. A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. Ghent, Bélgica. State Nematology and Entomology Research Station, 1972, 77p.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48:692, 1964.

MACHADO, A. C. Z. & SILVA, S. A. Extração de Nematoides. In: MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. C. B. (eds). Métodos em Nematologia Agrícola. Sociedade Brasileira de Nematologia, Piracicaba, p. 9-35, 2019.