



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS MORRINHOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Latu Sensu* EM ENSINO DE CIÊNCIAS E
MATEMÁTICA

MANUAL DE AULAS PRÁTICAS DE NEMATOLOGIA AGRÍCOLA

Flavia Cristina Costa Gomes

MORRINHOS – GOIÁS – BRASIL

Agosto de 2018.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

CAMPUS MORRINHOS

MANUAL DE AULAS PRÁTICAS DE NEMATOLOGIA AGRÍCOLA

Flavia Cristina Costa Gomes

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do título
de Especialista em Ensino de
Ciências e Matemática pelo Instituto
Federal Goiano, Campus Morrinhos,
sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo
Vieira da Silva.

MORRINHOS – GOIÁS – BRASIL

Agosto de 2018.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Morrinhos

G633m Gomes, Flávia Cristina Costa.
Manual de aula práticas de nematologia agrícola. / Flávia Cristina Costa
Gomes. – Morrinhos, GO: IF Goiano, 2018.
81 f. : il. color.

Orientador: Dr. Rodrigo Vieira da Silva.

Monografia (especialização) – Instituto Federal Goiano Campus
Morrinhos, Especialização em Ensino de Ciências e Matemática, 2018.

1. Nematoda em plantas. 2. Plantas - parasitas. 3. Material didático. I.
Silva, Rodrigo Vieira da. II. Instituto Federal Goiano. III. Título.

CDU 581.2

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS DE MORRINHOS
FOLHA DE APROVAÇÃO

Flavia Cristina Costa Gomes

MANUAL DE AULAS PRÁTICAS DE NEMATOLOGIA AGRÍCOLA

Trabalho de Conclusão de Curso DEFENDIDO em 16 de agosto de 2018, perante a Banca Examinadora constituída pelos membros:

Prof.^a Dr.^a. Mara Lucia Lemke de Castro

Prof.^a Ms. Brenda Ventura de Lima e Silva

Prof.^a Dr.^a. Kelly Cristiane de
Freitas Borges (Suplente)

Prof.^o Dr. Rodrigo Vieira, da Silva
Orientador – Instituto Federal Goiano

Avaliação: () Aprovado () Reprovado

Morrinhos, Goiás

Brasil

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me fortalecido ao ponto de superar as dificuldades e permitido alcançar mais esta importante etapa da minha vida acadêmica.

A esta instituição de ensino por disponibilizar os recursos necessários para evoluir e alcançar todas as minhas metas.

Aos professores, pelos ensinamentos que me foram transmitidos ao longo desta especialização. Em especial, ao professor Dr. Rodrigo Vieira da Silva por ter aceito me orientar e proposto este grande desafio, sou grata pelas orientações e pelo trabalho que juntos realizamos. Estendo meus agradecimentos à banca examinadora pelo aceite do convite e pelas considerações que serão apontadas, com a certeza de que serão de grande valia para o trabalho.

À minha família e todos os meus amigos de caminhada eu deixo uma palavra de gratidão por todo apoio, carinho e inspiração. Obrigada João Pedro Elias Gondim Amanda Marcussi Costa e Melissa Thiana Fedel Godinho, a ajuda de vocês foi essencial durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas que interferiram diretamente e indiretamente nesta minha grande viagem eu agradeço, pois de alguma forma vocês influenciaram em meu percurso.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação esquemática de divisão de uma propriedade em glebas ou talhões a serem amostrados.....	16
Figura 1.2 – Exemplos de esquemas de amostragem de solo	17
Figura 2.1 – Esquema representativo do Funil de Baermann.....	19
Figura 2.2 – Técnica do Funil de Baermann utilizada para a extração de Nematoides de solo	20
Figura 3.1 – Etapas do processo de extração de Nematoides segundo o método de Decantação, Peneiramento e Funil de Baermann	23
Figura 3.2 – Ilustração do método de Peneiramento de Solo e Funil de Baermann.....	23
Figura 4.1 – Esquema representativo da primeira e segunda etapa do método de Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose	27
Figura 17.1 – Representação esquemática da lâmina de Peters	57
Figura 19.1 – Escala para contagem de galhas e ootecas de <i>Meloidogyne</i> spp.....	62
Figura 23.1 – Tabela de soluções empregadas no preparo de lâminas permanentes	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
Roteiro de Aula Prática 01: Método de Coleta de Amostra de Solo e Raízes para Análise .	14
Roteiro de Aula Prática 02: Extração de Nematoides de Solo- Método do Funil de Baermann	18
Roteiro de Aula Prática 03: Extração de Nematoides de Solo- Método de Decantação, Peneiramento e Funil de Baermann	21
Roteiro de Aula Prática 04: Extração de Nematoides de Solo- Método de Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose	25
Roteiro de Aula Prática 05: Extração de Cisto de Nematoides de Solo- Método Para Extração de Cistos de <i>Heterodera glycyines</i> a Partir de Solo Seco	29
Roteiro de Aula Prática 06: Extração de Cisto de Nematoides de Solo-Método Para Extração de Cistos de <i>Heterodera glycyines</i> a Partir de Solo Úmido Utilizando Sacarose Densa	31
Roteiro de Aula Prática 07: Extração de Nematóide de Raízes- Método de Liquidificador e Centrífuga com Solução de Sacarose e Caolim	33
Roteiro de Aula Prática 08: Extração de Nematoides de Raízes- Técnica de Incubação de Raízes	36
Roteiro de Aula Prática 09: Extração de Nematoides de Partes Aéreas de Plantas	38
Roteiro de Aula Prática 10: Coloração de Nematoides em Tecidos de Plantas- Método da Fucsina Ácida	40

Roteiro de Aula Prática 11: Coloração de Nematoides em Tecidos de Plantas- Método de Coloração em Lacto Glicerol.....	43
Roteiro de Aula Prática 12: Coloração de Massas de Ovos (Ootecas) de <i>Meloidogyne</i> spp.- Método Utilizando Floxina B	46
Roteiro de Aula Prática 13: Coloração de Massas de Ovos (Ootecas) de <i>Meloidogyne</i> spp.- Método da Fucsina Ácida.....	48
Roteiro de Aula Prática 14: Coloração de Massas de Ovos (Ootecas) de <i>Meloidogyne</i> spp.- Método Utilizando Corantes Alimentícios	50
Roteiro de Aula Prática 15: Inoculação de Nematoides- Método para Obtenção de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio de <i>Meloidogyne</i> spp.- para Infestação de Solo	52
Roteiro de Aula Prática 16: Inoculação de Nematoides- Método para Obtenção de ovos e Juvenis de Segundo Estádio de <i>Heterodera glycines</i> para Infestação de Solo.....	54
Roteiro de Aula Prática 17: Inoculação de Nematoides- Calibração de Suspensão de Ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. e de <i>Heterodera glycines</i> para Inoculação	56
Roteiro de Aula Prática 18: Método de Extração e Calibração de Ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. para o Uso como Inóculo em Testes de Hospedeiro Diferencial	58
Roteiro de Aula Prática 19: Método do Teste com Hospedeiro Diferencial.....	61
Roteiro de Aula Prática 20: Identificação de Espécie e Raça- Método para a Obtenção de População Monoespecífica de <i>Meloidogyne</i> spp.....	64
Roteiro de Aula Prática 21: Preparação de Configurações Perineais- Método para Identificação de Espécies de <i>Meloidogyne</i>	66
Roteiro de Aula Prática 22: Preparo de Lâminas- Método para Preparo de Lâminas Temporárias com Espécimes de Nematoides	68
Roteiro de Aula Prática 23: Método para Montagem de Lâminas Permanentes em Glicerina... ..	70
Roteiro de Aula Prática 24: Método para Preparo de Lâminas Permanentes.....	73
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
5. REFERÊNCIAS	76

RESUMO

Os nematoides, também conhecidos como vermes cilíndricos, são considerados o grupo de metazoários mais abundantes na biosfera. Estima-se que existem aproximadamente, um milhão de espécies, sendo que somente cerca de 20 mil já foram identificadas e descritas. Os nematoides ocupam habitats mais variados que qualquer outro grupo de metazoários, salvo os artrópodes, podendo ser encontrados em diferentes locais como: lagos, rios, mares, solos, raízes e em outras partes das plantas, como caule e folhas. Quanto aos hábitos alimentares, os nematoides podem ser classificados em três grupos: os de vida livre, zooparasitas e os fitoparasitas ou fitonematoides. Os fitonematoides podem atacar culturas de interesse econômico e trazer sérios prejuízos afetando qualitativamente e quantitativamente a agricultura mundial. O ensino de Nematologia de Plantas é alvo de preocupação, pois o ensino da temática nos cursos de graduação nacionais, principalmente cursos de engenharia agrônoma enfrentam notórias dificuldades, como a baixa carga horária média de ensino de Nematologia, dificuldades no preparo de aulas práticas e na atualização do conteúdo das aulas, a baixa infraestrutura das escolas e universidades. Acredita-se que a edição e ampla distribuição gratuita de um e-book com material didático e de apoio ao professor poderia ter um grande efeito na melhoria do ensino de Nematologia tanto no ensino básico como nos cursos superiores de agronomia e áreas afins. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo principal organizar um manual de aulas práticas de Nematologia, que auxiliará tanto professores de biologia do ensino médio, quanto alunos e professores do ensino superior, principalmente os envolvidos nos cursos de agronomia e áreas afins, tendo em vista que o mesmo apresentará a descrição dos principais métodos práticos sobre Nematologia.

Palavras-chave: Ensino de Nematologia, Material Didático, Fitonematoides.

ABSTRACT

Nematodes, also known as cylindrical worms, are considered the most abundant metazoan group in the biosphere. It is estimated that there are approximately one million species, of which only about 20,000 have been identified and described. Nematodes occupy more varied habitats than any other group of metazoans, except for arthropods, and can be found in different places such as lakes, rivers, seas, soils, roots and other parts of plants, such as stems and leaves. As for eating habits, the nematodes can be classified into three groups: those of free life, zooparasites and phytoparasites or phytonematoids. Phytonematoids can attack crops of economic interest and bring serious damage affecting the world's agriculture qualitatively and quantitatively. The teaching of plant nematology is a matter of concern, since the teaching of the subject in the national undergraduate courses, mainly agronomic engineering courses, face notorious difficulties, such as the low average hours of teaching of Nematology, difficulties in the preparation of practical classes and in the updating of class content, the low infrastructure of schools and universities. It is believed that the free edition and free distribution of an e-book with didactic material and teacher support could have a great effect in improving the teaching of Nematology in both primary and higher education in agronomy and related fields. Thus, the main objective of this work was to organize a manual of practical classes in Agricultural Nematology, which will assist both high school biology teachers and students and teachers of higher education, especially those involved in agronomy courses and related areas. in view that it will present the description of the main practical methods on Nematology.

Keywords: Teaching of Nematology, Teaching Material, Phytonematoids.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides, também conhecidos como vermes cilíndricos são considerados o grupo de metazoários mais abundantes na biosfera. Estima-se que existam aproximadamente um milhão de espécies de nematoides, sendo que somente cerca de 20 mil já foram identificadas e descritas (EISENBACK, 1998).

Pertencentes a um filo próprio denominado Nematoda, os nematoides são animais invertebrados, geralmente microscópicos, medindo de 0,2 a 1,5 mm de comprimento, com poucas espécies que podem atingir 3,0 mm, ou até mais. Os nematoides, em geral, apresentam vida livre e, por serem altamente diversificados possuem diversos hábitos alimentares e apresentam diferentes papéis ecológicos no solo (MAGGENTI, 1981; BONGERS; FERRIS, 1999; HUGO et al., 2001).

Considerados os animais mais abundantes dentre os multicelulares, os nematoides ocupam habitats mais variados que qualquer outro grupo de metazoários, salvo os artrópodes. Podem ser encontrados em locais como: lagos, rios, mares solo, raízes e em outras partes das plantas como caules e folhas (MAGGENTI, 1981).

Segundo Trojan (2011), os corpos desses simples animais são mais longos do que largos e, são arranjados em formato de tubo contido dentro de uma cutícula flexível e dura. Não possuem sistema circulatório ou respiratório, porém os nematoides compõem-se da maioria dos sistemas de órgãos dos animais superiores, apresentando: sistema digestório, reprodutor, excretor e nervoso, além de diversos tipos de músculos.

Os nematoides apresentam dimorfismo sexual, sendo que fêmeas de certos gêneros são mais largas e sedentárias que os machos, apresentando pouca ou nenhuma mobilidade e os machos são esguios. Quanto ao crescimento e desenvolvimento, os adultos são maiores que os juvenis, sendo que o formato e tamanho podem variar de espécie para espécie (TROJAN, 2011).

Quanto à reprodução dos fitonematoides, cerca de 40% das espécies, a fêmea não necessita da presença do macho para originar a prole. O modo predominante de reprodução é a anfimixia ou fertilização cruzada, que envolve a participação de machos e fêmeas. Reprodução monossexuada por partenogênese – facultativa ou obrigatória também ocorre e nela o macho não é essencial, restringindo-se à fêmea; por sinal que a partenogênese é relativamente comum em fitonematoides de grande importância econômica, como em várias espécies dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, e a forma predominante de reprodução em

Xiphinema e *Longidorus*. O hermafroditismo é muito raro e há autores que consideram especulativa a sua ocorrência em fitonematoides (FERRAZ; BROWN, 2016).

Quanto aos hábitos alimentares, os nematoides, podem ser divididos em três grupos: os de vida livre, zooparasitas e os fitoparasitas ou fitonematoides. Os nematoides de vida livre alimentam-se de micro-organismos associados à decomposição da matéria orgânica, sendo considerados recicladores de nutrientes do solo e são muito importantes para o ecossistema. Também existem algumas espécies de nematoides de vida livre que são predadores, alimentando-se de outros nematoides. Os zooparasitas podem utilizar animais vertebrados ou invertebrados como hospedeiros, estabelecendo-se, definitiva ou temporariamente, em órgãos de seus sistemas digestório, circulatório, respiratório ou outros. Já os parasitas de plantas, por sua vez, perfazem aproximadamente 15% das espécies descritas (4100) dentro do filo Nematoda. Como as formas de vida livre, os fitonematoides são ainda relativamente pouco conhecidos pelo homem, apesar dos enormes prejuízos que podem causar à agricultura. Isso levou vários especialistas em Nematologia a denominá-los "os inimigos invisíveis das plantas" (FERRAZ; BROWN, 2016).

Os problemas com nematoides em geral são mais frequentes em climas quentes e úmidos, sendo que ambos se encaixam na zona ótima de reprodução e a temperatura ideal para o desenvolvimento dos nematoides varia entre 20 a 30 °C. A preferência por climas quentes é devido aos nematoides não conseguirem regular a temperatura interna de seus corpos. A temperatura e umidade do solo é que vão determinar a duração do ciclo de vida dos nematoides, sendo que, para penetração radicular a temperatura ideal é de aproximadamente 28°C, para eclosão é de aproximadamente 24 °C e para o desenvolvimento varia entre 28 a 31 °C (TROJAN, 2011).

Sendo o solo um ambiente com condições climáticas favoráveis para a sobrevivência e sua reprodução, os nematoides podem atacar culturas de interesse econômico e trazer sérios prejuízos afetando qualitativamente e quantitativamente o cultivo, podendo causar perdas anuais médias à produção agrícola mundial, estimadas em 12%, o que corresponde a bilhões de dólares de prejuízo (WEISCHER; BROWN, 2001), mas geralmente esse número é superior. Em termos mundiais, considera-se que essas perdas sejam de aproximadamente 100 bilhões de dólares por ano. No Brasil, os principais gêneros que atacam as culturas de maior importância são: *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Xiphinema*, *Rotylenchulus*, *Tylenchulus*, dentre outros (SASSER; FRECKMAN, 1987).

Vários estudos foram e são desenvolvidos para tentar diminuir danos e prejuízos na agricultura causados pelos nematoides. De acordo com o Cadastro de Líderes de Estudo de

Pesquisa em Nematologia no Brasil (2016), disponível no site da Sociedade Brasileira de Nematologia, existem quarenta líderes de pesquisas cadastrados desenvolvendo estudos em diversas áreas da Nematologia, como: Biologia, Ecologia, Morfologia, Taxonomia, Genética, Epidemiologia, Fitonematologia, dentre outras, porém poucos trabalhos são desenvolvidos e publicados sobre o ensino de Nematologia.

Estudos revelam que o ensino de Nematologia de Plantas é motivo de preocupação, pois o ensino da temática nos cursos de graduação nacionais, principalmente cursos de engenharia agrônoma enfrentam notórias dificuldades. A preocupação com a qualidade do ensino de Nematologia não é atual, pois Cobb em 1929 já argumentava sobre tal situação (SOUZA, DEL VALLE & SILVA, 2012). O estudo supracitado revelou aspectos preocupantes, como por exemplo, a baixa carga horária média de ensino de Nematologia, dificuldades no preparo de aulas práticas e na atualização do conteúdo das aulas, e a baixa infraestrutura das escolas e universidades, porém para a realização de aulas práticas laboratoriais, Capeletto (1992) afirma que não são necessários aparelhos e equipamentos caros e sofisticados, na falta deles, é possível, de acordo com a realidade de cada instituição de ensino, o docente realizar adaptações nas suas aulas práticas a partir do material existente e, ainda, utilizar materiais de baixo custo e de fácil acesso.

Por serem em geral animais microscópicos e translúcidos, os estudos sobre nematoides exigem mais do que aulas expositivas dialogadas com discussões sobre o assunto, para se obter uma melhor compreensão e assimilação da argumentação, é de extrema importância empregar a teoria na prática, ou seja, proporcionar aos aprendizes aulas expositivas dialogadas com prática laboratorial.

Hodson (1998) afirma que as atividades práticas podem ser feitas em laboratórios, como também através de trabalhos de campo, computadores e estudos em museus. No entanto, as aulas práticas no ambiente de laboratório podem despertar curiosidade e, conseqüentemente, o interesse do aluno, visto que a estrutura do mesmo pode facilitar, entre outros fatores, a observação de fenômenos estudados em aulas teóricas. O uso desse ambiente também é positivo quando as experiências em laboratório estão situadas em um contexto histórico-tecnológico relacionadas com o aprendizado do conteúdo, de forma que o conhecimento empírico seja testado e argumentado, para enfim acontecer à construção de ideias. Além disso, nessas aulas, os alunos têm a oportunidade de interagir com as montagens de instrumentos específicos que normalmente eles não têm contato em um ambiente com um caráter mais informal do que o da sala de aula (BORGES, 2002).

Souza, Del Valle & Silva (2012) acreditam que a edição e ampla distribuição gratuita de um e-book como material didático e de apoio ao professor, poderia ter um grande efeito na melhoria do ensino de Nematologia, tanto no ensino básico como no ensino superior. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo principal organizar um manual de aulas práticas de Nematologia, que auxiliará tanto professores de biologia do ensino médio, quanto alunos e professores do ensino superior, principalmente os envolvidos nos cursos de agronomia e áreas afins, tendo em vista que o mesmo apresentará a descrição dos principais métodos práticos sobre Nematologia.

Materiais didáticos contendo métodos práticos de áreas específicas, são raros na literatura e muitas vezes não são acessíveis em todas as bibliotecas, o que demonstra a importância do desenvolvimento e publicação de trabalhos nesse âmbito. Após a conclusão do presente Manual de Aulas Práticas de Nematologia Agrícola, objetiva-se a futura construção e publicação do mesmo no formato de livro.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Organizar um manual de aulas práticas de Nematologia para auxiliar estudantes, professores e profissionais da área e de outras afins.

2.1. Objetivos específicos

- Descrever os principais métodos utilizados em aulas práticas com nematoides.
- Contribuir com a literatura apresentando um material com os principais métodos de extração, coleta e identificação de nematoides.
- Facilitar o planejamento e organização das aulas práticas de fitonematologia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a construção do presente Manual de Aulas Práticas de Nematologia Agrícola, foi elaborado vinte e quatro roteiros de aulas práticas laboratoriais. Os mesmos foram construídos baseando-se em pesquisas bibliográficas, sites de domínio público, livros e artigos científicos.

O presente manual aborda os seguintes métodos: coleta de amostras de solo, extração de nematoides de solo, extração de cistos de nematoides de solo, extração de nematoides de raízes, extração de nematoides de partes aéreas de plantas, coloração de nematoides em tecidos de plantas, coloração de massas de ovos de *Meloidogyne* spp., inoculação de nematoides, método do teste hospedeiro diferencial, identificação de espécies e raças e métodos de preparo de lâminas temporárias e permanentes.

Cada roteiro de aula prática é composto por uma breve introdução sobre a presente aula prática, o objetivo que será alcançado com a aplicação da mesma, os materiais e equipamentos que serão utilizados durante o desenvolvimento da prática, normas de segurança para prevenção de acidentes, o passo a passo dos procedimentos e a sugestão de algumas referências bibliográficas sobre cada método.

Roteiro de Aula Prática 1 - Métodos de Coleta de Amostra de Solo e Raízes para Análise

1.1 Introdução

A identificação precisa de um fitonematoide no laboratório depende primariamente da qualidade das amostras de solo e raízes que serão coletadas. Portanto, essas amostras devem merecer especial atenção, devendo ser coletadas corretamente e, enviadas para exame e extração no laboratório o mais breve possível. É preciso coletar as amostras com a umidade natural do solo, evitando-se de todo modo que elas cheguem secas para análise, uma vez, que os nematoides não sobrevivem em solos e, ou, raízes secas e encharcadas

1.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é proporcionar aos discentes o passo a passo de uma coleta de amostra de solo e raízes para culturas anuais, perenes ou de viveiros de mudas para seguinte extração e identificação de nematoides.

1.3. Procedimentos para realização da aula

1.3.1. Materiais e equipamentos

Enxada, enxada ou trado,

Saquinhos plásticos,

Luvas,

Um balde,

Etiquetas,

Caneta,

Ficha de campo,

Prancheta,

Caixa térmica,

GPS.

1.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Os alunos devem se proteger com uso de protetor solar, boné ou chapéu e botina. Muito cuidado ao manusear o enxadão, enxada ou trado e coletar o solo com luvas.

Atenção!

Lembre-se: Os nematoides não sobrevivem em solos e raízes secas ou com excesso de umidade. Evite o ressecamento das raízes durante a coleta; na impossibilidade do envio imediato das amostras, guarde-as na geladeira.

1.4 Procedimentos

A seguir encontra-se o passo a passo para a coleta de amostras de solo e/ou raízes para culturas anuais, perenes ou em viveiros de mudas. Siga-os corretamente para que sua amostragem seja representativa, e sempre que precisar use o bom senso na hora da coleta das amostras, e caso haja necessidade, coletar o maior número de subamostras.

1º) Coletar as amostras de solo com a umidade natural, e evitar de todo modo que elas cheguem secas ao laboratório.

2º) Amostrar a área, caminhando em zigue-zague (*amostra 7 da figura 1.2*), abrindo o solo em forma de V, de 0 a 25 cm de profundidade, coletando uma camada deste solo, que deve ser colocada no balde.

3º) Para Culturas Anuais: (Ex.: soja, algodão, milho, olerícolas, etc.) tomar no mínimo 10 subamostras por hectare. Coletar na zona das raízes das plantas, incluindo sempre que possível, raízes na amostra.

4º) Para Culturas Perenes: (Ex.: café, figo, citros, etc.) coletar no mínimo 10 subamostras, nos quadrantes (Norte, Sul, Leste, Oeste), na projeção da copa, incluindo raízes, se possível.

Amostrar as zonas, focos ou reboleiras que apresentam fortes sintomas, sintomas médios e as áreas sem sintomas.

5º) Para Viveiros de Mudas: (Ex.: café, citros, seringueira, essenciais florestais, etc.) coletar aleatoriamente no mínimo 10 mudinhas para cada lote de 1000 mudas, tomando parte do solo e radículas de cada muda (sem precisar destruí-las) e ir colocando no balde.

6º) As subamostras de solo e/ou radículas coletadas no balde devem ser muito bem misturadas, tomando-se uma amostra composta de no mínimo 500 gramas de solo e

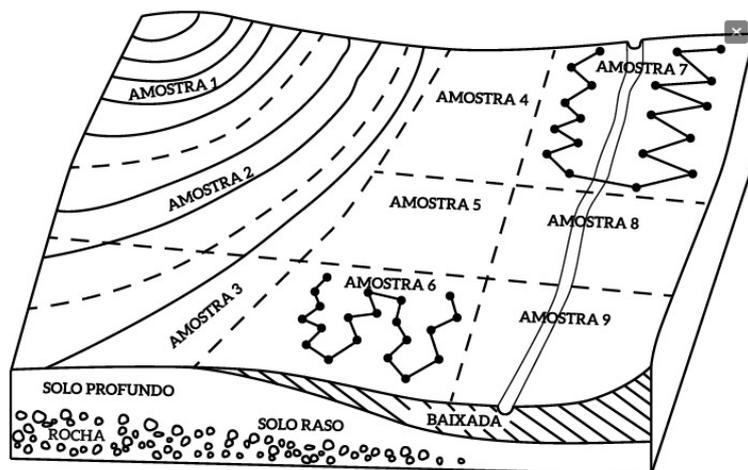
aproximadamente 10 gramas de radículas. Logo, deve-se coletar 1 amostra composta por hectare ou talhão homogêneo..

7º) Embalar as amostras coletadas em sacos plásticos, fechados para evitar perda de umidade, e devidamente identificados (local, data da coleta, proprietário, cultura, e outros dados que julgar necessário).

8º) Preencher sempre que possível, uma ficha de campo, fazendo um croqui da(s) área(s) amostrada(s).

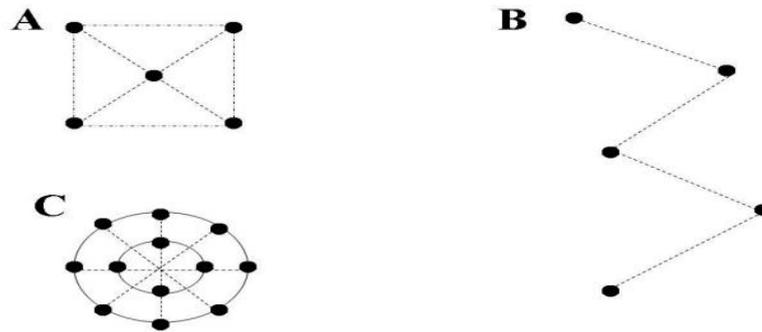
9º) Enviar as amostras o quanto antes ao laboratório, não deixar expostas ao sol ou local onde possam se aquecer, se possível colocar em uma caixa térmica ou debaixo de uma árvore. Se precisar, pode-se armazenar por algum tempo na parte de baixo de uma geladeira comum onde fica as frutas e hortaliças.

Figura 1.1 Representação esquemática de divisão de uma propriedade em glebas ou talhões a serem amostrados.



Fonte: www.laboratorioagrimonte.com.br/como-coletar/coleta-de-solos

Figura 1.2. Exemplos de esquemas de amostragem de solo 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) Amostra em zigue-zague (BARKER, 1985). (C) Esquema de círculos concêntricos: 12 subamostras compõem uma amostra composta (CARES & HUANG, 2008).



Fonte: Alexandre Moura Cintra Goulart

1.5 Referências sugeridas

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

BIGNALL, D. E. (Ed.). **A handbook of tropical soilbiology: sampling and characterization of below-ground biodiversity**. London: Earthscan, 2008. p. 97-106

CARES, J. E.; HUANG, S. P. Soilnematodes. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.;

COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agricultural Research Centre-GHENT, Belgium. 77 p.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

NOVARETTI, W.R. T. Coleta De Amostras De Raízes E Solo Para Análise Nematológica. 1. ed. Campinas-SP, 2011. 31p.

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 2: Extração de Nematoides de Solo – Método do Funil de Baermann (BAERMANN, 1917).

2.1 Introdução

O funil de Baermann pode ser usado para extrair nematoides de: solo, resíduos de peneiras, e partes de tecidos vegetais. Somente nematoides ativos móveis, podem ser isolados por este processo. É especialmente útil para as espécies de *Pratylenchus* durante o verão e outras épocas quando tais nematoides (endoparasitas migratórios) acham-se em tecidos de plantas. O princípio do método é a força da gravidade, pois os nematoides vivos movem-se no solo úmido, caem na água do funil e sedimentem-se na ponta do tubo plástico, onde então são coletados.

Vantagens: É um método simples de ser executado, barato e de fácil manuseio.

Desvantagens: É um procedimento demorado, os nematoides devem estar vivos, nematoides de pouca mobilidade e com cutícula anelada não passa pelo filtro e possui baixa eficiência.

2.2 Objetivo

O objetivo da presente aula prática é proporcionar aos discentes o passo a passo da extração de nematoides de solo aplicando o método de Funil de Baermann descrito em 1917.

2.3. Procedimentos Para Realização da Aula

2.3.1. Materiais e Equipamentos

Amostras de solo coletadas seguindo o método de coleta de solos descrito anteriormente;

Luvas;

Funil cônico de vidro ou plástico;

Mangueira de látex para ligar ao pé do funil;

Presilha de mohr;

Suporte de malha de aço ou de madeira;

Filtro de papel;

Água;

Lupa;

Copo americano;

Placa de petri ou siracuse;

Microscópio estereoscópio (lupa)

Microscópio de Luz.

2.3.2. Normas de segurança para a aula, sugestões para consolidação da prática

Os alunos devem se proteger fazendo uso de luvas e jaleco.

2.4 Procedimentos

1º) Monte a mangueira de látex no final do funil em seguida feche a saída da mangueira com a pinça de mohr, para não haver perda de água durante o método.

2º) Apoie o funil sobre o suporte de aço ou de madeira.

3º) Coloque o filtro de papel dentro funil e em seguida coloque uma quantidade de amostra de solo no mesmo.

4º) Complete o filtro de papel no funil com água, para que os nematoides desçam e passe pelo filtro. Deixe o funil em repouso de 12 a 24 horas.

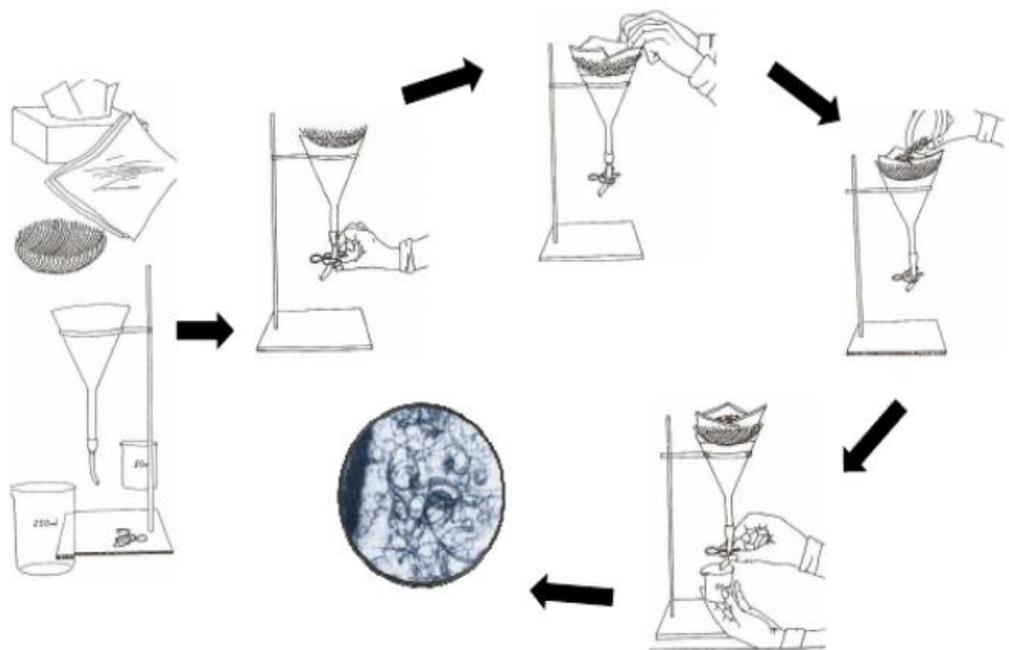
5º) Após o descanso, colha uma fração da água do funil por meio da abertura da presilha de mohr. Em seguida, os nematoides podem ser pescados na lupa e posteriormente analisados e identificados em microscópio de luz.

Figura 2.1- Esquema resrepresentativo do Funil de Baermann



Fonte: Imagem retirada no site: www.ebah.com.br/exames-parasitologia

Figura 2.2. Técnica do Funil de Baermann utilizada para a extração de nematoides do solo.



Autor: Isac Lopes

2.5 Referências sugeridas:

BAERMANN, G. 1917. Eine Einfache Methode Zur Auffindung Von Ankvlostomum (nematoden) Larven in Erdproben. Tijdschr. Ned.-Indie 57:131-137.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

METODO de Decantação Peneiramento e Funil de Baerman High quality and size. Direção de Milton Lima. Urutaí-GO: Instituto Federal Goiano, 2011. Color. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=ClOoxU75BcE>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

TÉCNICAS de extração de nematoides. Direção de Milton Lima. Produção de Danilo Messias. Urutaí-GO: Instituto Federal Goiano, 2011. Color. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=kuyIH-tJcoQ>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

Roteiro de Aula Prática 3: Extração de Nematoides de Solo – Método de Decantação, Peneiramento e Funil de Baermann

3.1. Introdução

O presente método é muito utilizado para extração de nematoides de solo além de servir para reduzir o volume das amostras obtidas de outros métodos. Consiste na utilização de peneiras sobrepostas e posteriormente funil de Baermann. Geralmente, as peneiras utilizadas nesse método possuem malha de 20 a 500 mesh, sendo possível realizar a extração e coleta de ovos de nematoides.

3.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é proporcionar aos discentes o passo a passo da extração de nematoides de solo aplicando o método de Decantação e Peneiramento juntamente com o método do Funil de Baermann.

3.3. Procedimentos para realização da aula

3.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,

Balde ou bacia,

Água,

Peneira de malha de 400 mesh com abertura de 0,037 mm,

Peneira de malha de 250 mesh com abertura de 0,063 mm,

Peneira de malha de 20 mesh com abertura de 0,841 mm,

Funil de Baermann,

Pisseta,

Copo americano 150 mL,

Placa de Petri (dimensão:),

Balança analítica.

3.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Os alunos devem fazer uso de luvas e jaleco durante o procedimento.

3.3.3 Atenção!

Para quem pretende coletar ovos de nematoides é necessário utilizar peneira de 500 mesh com abertura de 0,025 micrômetros no lugar da peneira de 400 mesh.

3.4 Procedimentos

1º) Em um recipiente e utilizando a balança, separe 100 gramas do solo coletado. Em seguida transfira o solo para um balde.

2º) Adicione 2 litros de água no balde e misture bem para quebrar os torrões maiores resultando em uma mistura homogênea. Em seguida, deixe a mistura descansando por 20 segundos.

3º) Após os vinte segundos passe para a etapa do peneiramento. Sobreponha as peneiras na seguinte ordem: peneira de 20 mesh, peneira de 250 mesh e por fim a peneira de 400 mesh. Em seguida, despeje vagarosamente a mistura que estava decantando nas peneiras, evitando deixar cair o final da mistura (a parte mais grosseira da mistura). A intenção é que os nematoides fiquem retidos na peneira de 400 mesh.

4) Após o peneiramento, usando uma pisseta e com jatos fortes de água, recolha o líquido e os nematoides da peneira de 400 mesh para um béquer de 100 mL.

6º) Despeje o líquido do béquer com os nematoides no funil de Baermann e deixe descansando de 12 a 24 horas para posteriormente recolher os nematoides.

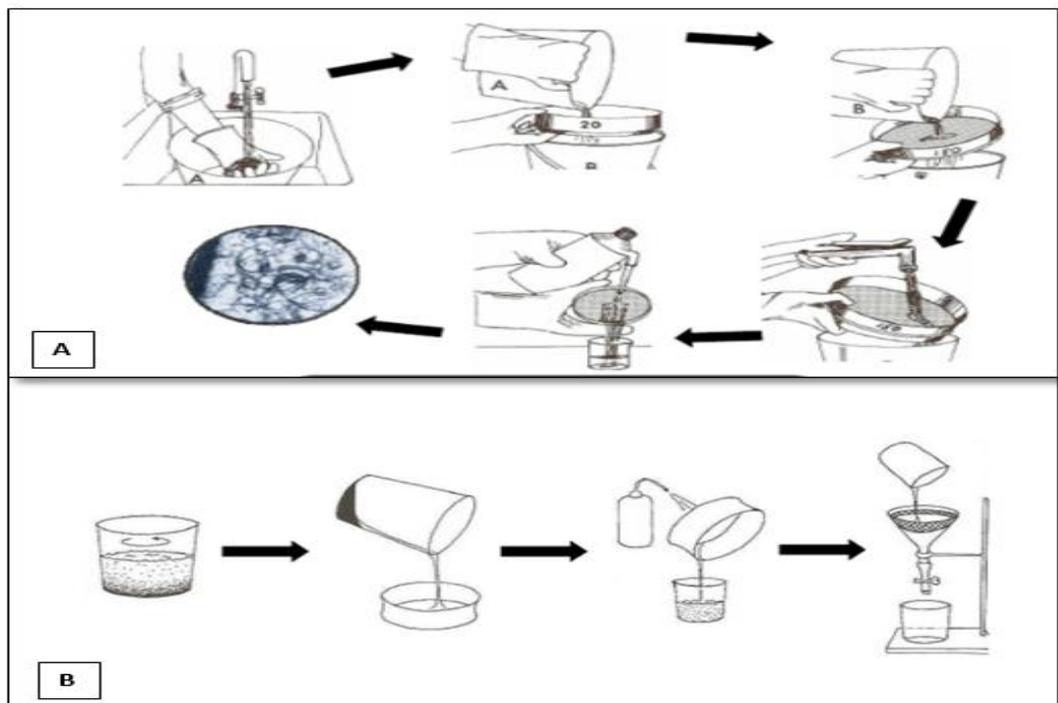
7º) Recolha a água do funil de Baermann em uma placa de Petri e utilize a lupa para fazer a pescagem e contagem dos nematoides.

Figura 3.1: Etapas do processo de extração de nematoides seguindo o método de Decantação, Peneiramento e Funil de Baermann. (A) Pesagem da amostra de solo coletada; (B) Amostra de solo no balde com adição de água para efetuar a mistura, seguindo o período de decantação; (C) Etapa do peneiramento da mistura; (D e E) Jatos de água recolhendo o líquido com os nematoides da peneira de malha de 400 mesh; (F) líquido com os nematoides sendo depositado no funil de Baermann.



Fonte: Milton Lima- Método de Decantação Peneiramento e Funil de Baermann High qualityandsize/ youtube.com.br

Figura 3.2: (A) Ilustração do método de peneiramento de solo (COBB, 1918); (B) Ilustração do método de peneiramento mais funil de Baermann



Autor: Isac Lopes

3.5 Referências sugeridas:

BAERMANN, G. 1917. Eine Einfache Methode Zur Auffindung Von Ankvlostomum (nematoden) Larven in Erdproben. Tijdschr. Ned.-Indie 57:131-137.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

METODO de Decantação Peneiramento e Funil de Baerman High quality and size. Direção de Milton Lima. Urutaí-GO: Instituto Federal Goiano, 2011. Color. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=CIOoxU75BcE>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

TÉCNICAS de extração de nematoides. Direção de Milton Lima. Produção de Danilo Messias. Urutaí-GO: Instituto Federal Goiano, 2011. Color. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=kuyIH-tJcoQ>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

Roteiro de Aula Prática 4: Extração de Nematoides de Solo – Método da Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose (JENKINS, 1964).

4.1 Introdução

O método de extração de nematoides por centrifugação é atualmente, o mais utilizado na rotina dos laboratórios de nematologia. Pode ser utilizado para extração de nematoides de solo e raízes, sendo eficaz para os nematoides de pouca mobilidade, como os Criconematidoidea. É usado também para clarificar amostras obtidas pelo peneiramento ou pelo elutriador. A flutuação é o princípio utilizado na segunda fase do método de centrifugação. Com o uso de soluções densas como solução de sacarose, os nematoides tornam-se mais leves, permanecendo na parte superior do descanso, e os detritos vegetais e as partículas de solo, mais pesados decantam para o fundo.

Vantagens: Extração de ovos, nematoides imóveis e mortos; método rápido; amostra limpa.

Desvantagens: Sacarose pode afetar o nematoide; solos argilosos são mais difíceis; perda de nematoides pelas peneiras; resultados variam com os operadores; economicamente caro.

4.2 Objetivo

O objetivo da presente aula prática é proporcionar aos discentes o passo a passo da extração de nematoides de solo aplicando o método da flotação em centrífuga com solução de sacarose descrito por Jenkins (1964).

4.3. Procedimentos para realização da aula

4.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,

Balde ou bacia,

Água,

Açúcar,

Peneira de malha de 400 mesh com abertura de 0,037 mm,

Peneira de malha de 250 mesh com abertura de 0,063 mm,

Peneira de malha de 20 mesh com abertura de 0,841 mm,

Pisseta,

Pipetador,

Bastão de vidro,

Béquer 100 ml,

Tubos de ensaio 50 ml,

Cronômetro,

Balança,

Centrífuga,

Microscópio de luz.

4.3.2. Normas de segurança para a aula, sugestões para consolidação da prática

Os alunos devem fazer uso de luvas e jaleco durante o procedimento.

4.3.4 Atenção!

Observe se a centrífuga está com os pés balanceados, se por acaso não estiver, é possível que durante o processo de centrifugação a mesma altere o resultado final do método.

Quando for repetir o processo de centrifugação seja cuidadoso e preciso com o tempo de centrifugação, se passar de um minuto na solução de sacarose pode ocorrer deformação e, ou, a morte dos nematoides.

4.4. Procedimentos

1º) Siga todos os passos do método de Decantação, Peneiramento e Funil Baermann descrito no roteiro anterior (menos os passos do funil Baermann na Placa de Petri), até obter em um béquer, a suspensão de nematoides, com aproximadamente 40 mL.

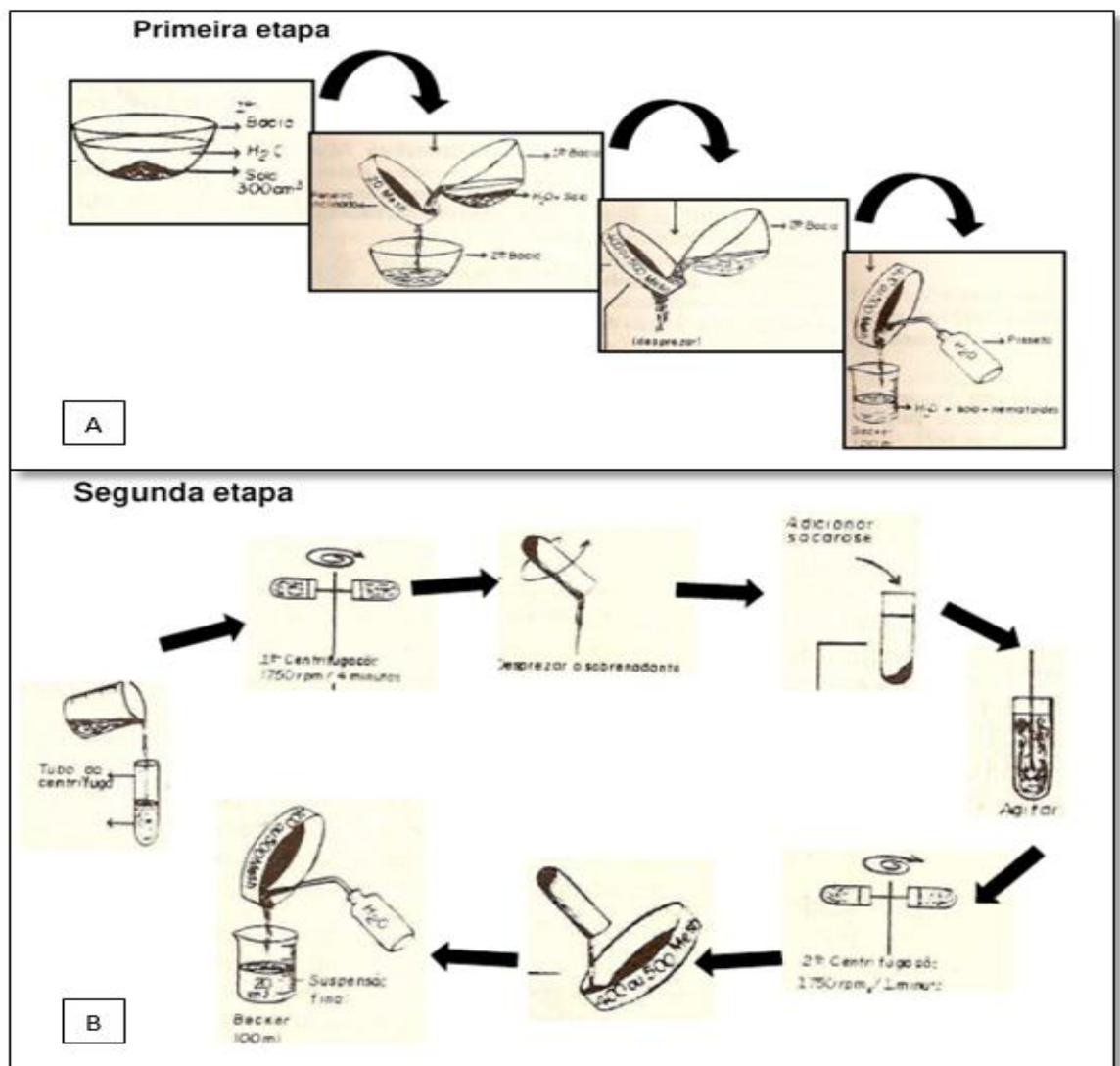
2º) Coloque o líquido do béquer nos tubos de centrifuga de 50 mL, tendo o cuidado para que fiquem balanceados. Centrifugue por 4-5 minutos a uma velocidade de 1750 rpm.

3º) Elimine cuidadosamente o líquido sobrenadante com o auxílio do pipetador, limpe as bordas dos tubos e adicione a solução de açúcar (454 g açúcar + 1000 mL água), previamente colocada em um béquer ou pisseta; procure misturar bem os sedimentos com um bastão de vidro. Centrifugue novamente a 1750 rpm por um minuto no máximo, usando um cronômetro

para auxiliar no controle do tempo de centrifugação (Cuidado com o tempo de centrifugação. Seja rápido nesta fase).

4º) Verta o sobrenadante em uma peneira 400 mesh, derrame bastante água na peneira; recolha os nematoides com jatos de água da pisseta, para um béquer. Recolha 20 mL e leve para observação, identificação e contagem sob microscópio.

Figura 4.1: (A) Esquema representativo da primeira etapa do método: Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose descrito por Jenkins (1964); (B) Esquema representativo da segunda etapa do método: Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose descrito por Jenkins (1964).



Autor: Isac Lopes

4.5. Referências sugeridas:

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

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 5: Extração de Cisto de Nematóide de Solo- Método para Extração de Cistos de *Heterodera glycines* a Partir de Solo Seco (SHEPHERD, 1970).

5.1 Introdução

Existem vários métodos que são utilizados para extrair nematoides de solo e raízes, como o Funil de Baermann, a Decantação e Peneiramentos associados ao Funil de Baermann e o método de flotação Centrífuga em Solução de Sacarose. O presente método é aplicado quando pesquisador ou aprendiz queira extrair cistos de nematoides a partir de solo seco da espécie *Heterodera glycines*, conhecido com o nematóide de cisto da soja, muito comum nas lavouras de soja no Brasil., seguindo a descrição de Shepherd (1970).

5.2. Objetivo

A presente aula prática tem por objetivo extrair cistos de *Heterodera glycines* a partir de solo seco, seguindo a metodologia de Shepherd (1970).

5.3. Procedimentos para realização da aula

5.3.1. Materiais e equipamentos

Microscópio estereoscópio,

Amostras de solo seco,

Erlenmeyer de 2L,

Água,

Peneira de 60 mesh com abertura de 0,250 mm

Peneira de 100 mesh com abertura de 0,150 mm,

Pisseta,

Placas de fundo quadriculado.

5.3.2. Normas de segurança para a aula, sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

5.4 Procedimentos

1º) Coloque a amostra de solo secado ao ar (cerca de 100 mL) em um Erlenmeyer de 2L e adicione água de torneira até cerca de um quarto do seu volume.

2º) Agite o frasco com movimento rotatório até todo o solo estar em suspensão.

3º) Encha o Erlenmeyer (até o pescoço), usando jatos fortes de água de torneira, e finalmente, complete o volume.

4º) Deixe decantar até que a água no “pescoço” do Erlenmeyer esteja clara.

5º) Cuidadosamente, verta o sobrenadante sobre as peneiras de 60 mesh e 100 mesh, girando o frasco para que todo o material em suspensão seja levado para as peneiras, porém sem ressuspender o solo do fundo.

6º) Enxágue o material da peneira de 60 mesh e recolha o que ficou retido na de 100 (essa suspensão contém cistos e resíduos de solo e raízes).

7º) Transfira a suspensão para placas de fundo quadriculado e analise sob microscópio estereoscópio.

8º) Alternativamente, esse material pode ser filtrado em funil de Buchner forrado com papel-filtro. Em seguida, transporte o papel-filtro para o microscópio estereoscópio e, sob luz incidente, efetue a leitura.

5.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

Roteiro de Aula Prática 6: Extração de Cisto de Nematóide de Solo- Método para Extração de Cistos de *Heterodera glycines* a Partir de Solo Úmido Utilizando Solução de Sacarose Densa (DUNN, 1969).

6.1. Introdução

O presente método é semelhante ao descrito anteriormente, porém o mesmo é aplicado quando se deseja extrair cistos de nematoides da espécie *Heterodera glycines* a partir de solo úmido, seguindo a metodologia de Dunn (1969).

6.2. Objetivo

A presente aula prática tem como objetivo extrair cistos de *Heterodera glycines* a partir de solo úmido, seguindo a metodologia de Dunn (1969).

6.3. Procedimentos para realização da aula

6.3.1. Materiais e equipamentos

Centrífuga de bancada,

Microscópio estereoscópio,

Amostras de solo úmidas,

Balde 2L,

Água,

Peneira de 100 mesh com abertura de 0,150 mm,

Açúcar,

Pisseta,

Tubo de centrífuga,

Béquer,

Placas de fundo quadriculado.

6.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

6.4 Procedimentos

- 1º) Coloque a amostra de solo (cerca de 100 mL) em um balde de 2L e adicione água de torneira para destorroar o solo.
- 2º) Passe o sobrenadante pela peneira de 20 mesh e recolha em outro balde. Deixe em repouso durante cinco segundos.
- 3º) Verta o sobrenadante em uma peneira de 100 mesh.
- 4º) Recolha o que ficou retido na peneira com uma solução de açúcar (615 g de açúcar + água para fazer 1 L de solução), previamente colocada em uma pisseta, em um tubo de centrífuga.
- 5º) Centrifugue por 2,5 minutos a uma velocidade de 420 x grama
- 6º) Colete o sobrenadante em uma peneira de 100 mesh e enxágue para eliminar a solução de sacarose.
- 7º) Recolha o resíduo da peneira em um béquer ou copo americano.
- 8º) Transfira a suspensão para placa de fundo quadriculado e analise sob microscópio estereoscópio. (Esse material pode também ser filtrado em um em funil de Buchner forrado com papel-filtro. Em seguida, transporte o papel- filtro para o microscópio estereoscópio e, sob luz incidente, efetue a leitura).

6.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

Roteiro de Aula Prática 7: Extração de Nematoides de Raízes - Método do Liquidificador e Centrifugação com Solução de Sacarose e Caolim (COOLEN & D'HERDE, 1972).

7.1 Introdução

O método de extração de nematoides de raízes utilizando o liquidificador, centrifugação com solução de sacarose e caolim é ideal para extração de ovos e larvas de raízes infestadas por *Meloidogyne* spp., mas também pode ser usado para extrair formas jovens e adultos de alguns nematoides endoparasitas como *Pratylenchus*, *Radopholus*, entre outros.

7.2 Objetivo

O objetivo da presente aula prática é proporcionar aos discentes o passo a passo da extração de nematoides presentes em raízes de culturas, aplicando o método: Liquidificador e Centrifugação com Solução de Sacarose e Caolim, descrito por Coolen & D'herde (1972).

7.3 Procedimentos para realização da aula

7.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,

Balde,

Saquinhos plásticos,

Enxada, enxadão ou trado,

Tesoura,

Liquidificador,

Peneira de 20 mesh com abertura de 0,841 mm,

Peneira de 400 mesh com abertura de 0,037 mm ou de 500 mesh com abertura de 0,025 mm,

Béquer 100 mL,

Centrífuga de bancada,

Tubos de ensaio de centrífuga,

Caolim,

Pipetador,

Água,

Sacarose,

Bastão de vidro,

Pisseta,

Balança,

Cronômetro,

Lupa,

Microscópio.

7.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Os alunos devem se proteger com uso de protetor solar, boné ou chapéu e botina. Muito cuidado ao manusear o enxadão, enxada ou trado. Durante o desenvolvimento da parte laboratorial, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

7.3.3 Atenção!

Observe se a centrífuga está com os pés balanceados, se acaso não estiver, é possível que durante o processo de centrifugação a mesma altere o resultado final do método. Sempre utilizar número par de tubos e em posição paralela. Quando for repetir o processo seja cuidadoso e preciso com o tempo de centrifugação, se passar de um minuto na solução de sacarose pode ocorrer morte de nematoides.

7.4 Procedimentos

1º) Colete as raízes infestadas, lave-as e as corte em pedaços de aproximadamente 1 cm. Homogeneizar e pesar 10 gramas.

2º) Triture as raízes em liquidificador por 20 segundos na velocidade mínima, adicionando NaOC1 (Hipoclorito de sódio = água sanitária a 0,5%) até cobrir as raízes.

3º) Passe os restos vegetais mais o líquido em peneira de 20 mesh, sobreposta na peneira de 400 mesh (ou 500). Aplicando um jato de água com auxílio de uma pisseta recolha a suspensão de nematoides mais tecido vegetal em um béquer ou copo americano de 150 mL.

4º) Transfira a suspensão mais os restos vegetais para os tubos de centrífuga, tomando o cuidado de equilibrá-los.

5º) Adicione nos tubos 1 mL de Caolim, misture bem com um bastão de vidro e coloque na centrífuga. Centrifugue por 4-5 minutos a 1750 rpm.

6º) Elimine cuidadosamente o líquido sobrenadante com pipetador e limpe as bordas dos tubos. Em seguida, adicione a solução de açúcar (400 gramas de açúcar em 750 mL de água). Misture bem com um bastão de vidro. Centrifugue novamente a 1750 rpm por exatamente 1 minuto. Cuidado com o tempo de centrifugação.

7º) Verta o sobrenadante em uma peneira 400 mesh (ou 500), derrame bastante água na peneira; recolha os ovos e nematoides com jatos de água da pisseta para um béquer. Recolha aproximadamente 20 mL e leve para observação, identificação e contagem.

7.5 Referências sugeridas:

COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agricultural Research Centre-GHENT, Belgium. 77 p.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 8: Extração de Nematoides de Raízes- Técnica de Incubação de Raízes (YOUNG, 1954)

8.1. Introdução

Com a aplicação deste método, é possível extrair endoparasitas das raízes de culturas como *Pratylenchus*, *Radopholus* além de estádios imaturos e machos de parasitas sedentários. Tarjan (1960) descobriu que os sacos de polietileno permitem melhor extração do que as jarras de vidro, e a oxigenação poderiam ser aumentadas, bem como a extração dos nematoides, pela adição das raízes em água contendo de 1 a 3% de água oxigenada (H₂O₂). Outra técnica simples é manter as raízes imersas em água e injetar oxigênio por meio de uma bomba de aquário.

8.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é proporcionar aos discentes as etapas do procedimento de extração de nematoides presentes em raízes de culturas, aplicando o método de incubação de raízes descrito por Young (1954).

8.3. Procedimentos para realização da aula

8.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,

Enxada, enxadão ou trado,

Balde,

Tesoura,

Água,

Bisturi,

Jarra de compota ou placa de Petri com tampa ou sacos de polietileno,

Peneira de 150 mesh com abertura de aproximadamente 0,100 mm,

Peneira de 400 mesh com abertura de 0,037 mm,

Lupa,

Microscópio.

8.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Os alunos devem se proteger com uso de protetor solar, boné ou chapéu e botina. Muito cuidado ao manusear o enxadão, enxada ou trado. Durante o desenvolvimento da parte laboratorial, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

8.3.4 Procedimentos

1º) As raízes devem ser lavadas, retirando-se o solo aderido, e cortadas em pedaços de 1-2 cm; raízes grossas podem ser cortadas longitudinalmente para facilitar a saída dos nematoides.

2º) Coloque essas raízes em recipientes como jarras de compotas, placas de petri 60 x 15 mm fechadas com suas respectivas tampas, ou mesmo sacos de polietileno e deixe em repouso por 24 horas em temperatura ambiente.

3º) Após as 24 horas a temperatura ambiente, recolha a água dos recipientes em uma peneira de 150 mesh acoplada a outra de 400 mesh, obtendo-se uma suspensão com nematoides para contagem e identificação. A extração pode continuar por mais 4 a 7 dias, basta trocar periodicamente a água do recipiente. Vale ressaltar que a extração dos nematoides pode ser mais efetiva, quando o nível de oxigenação da água for elevado com 1 a 3% de água oxigenada (H₂O₂). Outra técnica simples é manter as raízes imersas em água e injetar oxigênio por meio de uma bomba de aquário.

8.3.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TARJAN A.C. 1960. A comparison of polyethylene e plastic bags and glassjars as incubation chambers of obtaining nematodes from roots. *Plant Disease Report*, 44:574-577.

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

YOUNG, T. W. 1954. Na incubation methon for collecting migratory end o parasite ic nematodes. *Plant Disease Reporter*, 38:794-795.

Roteiro de Aula Prática 9: Extração de Nematoides de Partes Aéreas de Plantas

9.1. Introdução

Existem espécies de nematoides como *Bursaphelenchus cocophilus* (causador do anel vermelho do coqueiro), *Bursaphelenchus xylophilus* (parasita de *Pinus* spp.), *Ditylenchus repnanocercus* (parasita de folhas de crisântemo, morango e arroz) e *Ditylenchus dipsaci* (parasita de alho e cebola) que são extraídos das partes aéreas de plantas. O presente método detalhará como fazer a extração dessas espécies de nematoides supracitadas.

9.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é promover a extração de nematoides de partes aéreas de plantas.

9.3. Procedimentos para realização da aula

9.3.1. Materiais e equipamentos

Pedaços de bulbo, estipe ou folhas da cultura,

Água,

Tesoura,

Bomba de aquário,

Peneira de 100 mesh com abertura de 0,150 mm,

Peneira de 500 mesh com abertura de 0,025 mm,

Pisseta,

Copo ou béquer.

9.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

9.4 Procedimentos

1º) Lave os pedaços de bulbo, estipe ou folhas e pique-os com tesoura .

2º) Após picados coloque-os em água sob aeração forçada com a bomba de aquário. O material pode ficar de 24 a 48 horas nesse processo.

3º) Verta a suspensão sobre a peneira de 100 mesh acoplada a outra de 500 mesh.

4º) Lave a peneira de 500 mesh com jatos d'água com o auxílio de uma pisseta e colete o resíduo contendo os nematoides em um copo americano ou béquer.

9.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 10: Coloração de Nematoides em Tecidos de Plantas- Método da Fucsina Ácida (BYR et al., 1983)

10.1 Introdução

Os nematoides fitoparasitas são organismos extremamente pequenos (microscópicos) e translúcidos, quase transparentes, passando na maioria das vezes despercebidos pelos agricultores, e até mesmo, aos agrônomos. O método da fucsina ácida tem função de promover a coloração dos nematoides, facilitando desta maneira a quantificação dos mesmos quando presentes em raízes, além de facilitar a visualização de suas estruturas morfológicas. O método é extremamente eficiente, porém, é de suma importância que o processo de coloração seja feito corretamente para não danificar o nematoide.

10.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é desenvolver com os estudantes a coloração de fitonematoides por meio do método da fucsina ácida, descrito por Byrd et al. (1983).

10.3. Procedimentos para realização da aula

10.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,

Água,

Tesoura,

Béquer 100 mL,

Bastão de vidro,

Peneira de nylon pequena,

Chapa aquecedora,

Hipoclorito de sódio NaOCl,

Glicerina,

Ácido clorídrico,

Lâmina,

Lamínula,

Microscópio fotônico.

10.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da parte laboratorial, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

10.3.3 Atenção!

Na realização deste método deve-se ter cuidado na manipulação do ácido clorídrico e no aquecimento das soluções na chapa quente.

Para realização deste método faz-se necessário a preparação de uma solução corante composta de:

75 mL de água destilada

25 mL de ácido acético

350 mg fucsina ácida (0,35 g).

10.4 Procedimentos

- 1º) Lave bem as raízes coletadas retirando todo o solo aderido, sem danificá-las.
- 2º) Corte as raízes em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm.
- 3º) Coloque as mesmas em um béquer contendo: 50 mL de água e 30 mL de NaOCl (Hipoclorito de sódio = 5,2% de cloro ativo).
- 4º) Deixe-as durante 6 minutos na solução, agitando ocasionalmente com bastão de vidro.
- 5º) Retire as raízes e lave-as em água corrente por 30 a 45 segundos para retirar resíduos de água sanitária (para facilitar use uma pequena peneira com tela de nylon).
- 6º) Coloque as raízes em um béquer com água durante 15 minutos.
- 7º) Transfira as raízes para um béquer contendo 30 mL de água e 1 mL da solução corante fucsina ácida ($C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$). Aqueça essa mistura na chapa aquecedora e assim que a mistura começar a ferver então marque 30 segundos e desligue-a.
- 8º) Esfrie as raízes em temperatura ambiente e lave-as em água corrente para remover o excesso de corante.

9º) Coloque as raízes em um béquer com 20 a 30 mL de glicerol (glicerina) acidificada com algumas gotas de ácido clorídrico (HCl). Aqueça as raízes novamente e deixe esfriar.

10º) Após esfriar, monte lâminas com o material e observe em microscópio óptico.

10.5 Referências sugeridas:

ARAÚJO, F. G. et al. Comparação Entre Técnicas de Coloração de Raízes de Soja Infectadas por *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*. **Multi-Science Journal**. Urutá-GO, 2015. p. 100-105.

BYRD, Jr., D.W; KIRKPATRICK, J. & BARKER, K.R, 1983. Na improved technique for clearing and staining planttissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15 (1) : 142-143.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 11: Coloração de Nematoides em Tecidos de Plantas- Método de Coloração em Lacto- Glicerol

11.1. Introdução

Os nematoides fitoparasitas são organismos extremamente pequenos (microscópicos) e translúcidos, quase transparentes, passando na maioria das vezes despercebidos pelos agricultores, e até mesmo, aos agrônomos. O método da fucsina ácida tem função de promover a coloração dos nematoides, facilitando desta maneira a quantificação dos mesmos quando presentes em raízes, além de facilitar a visualização de suas estruturas morfológicas. O método é extremamente eficiente, porém, é de suma importância que o processo de coloração seja feito corretamente para não danificar o nematoide.

11.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é desenvolver juntamente com os estudantes a coloração de fitonematoides por meio do método de coloração em lacto-glicerol.

11.3. Procedimentos para realização da aula

11.3.1. Materiais e equipamentos

Enxada, enxadão ou trado,

Balde,

Luvas,

Água,

Béquer 100 mL,

Béquer 150 mL,

Anilina azul ou fucsina ácida,

Ácido láctico,

Glicerina pura,

Água destilada,

Chapa aquecedora,

Autoclave,

Dessecador.

11.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante a coleta das raízes, os alunos deverão se proteger com o uso de protetor solar, bonés ou chapéus e botina. Durante o desenvolvimento da parte laboratorial, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

11.3.3 Atenção!

Muito cuidado ao manusear a enxada, enxadão ou o trado.

11.4 Procedimentos

- 1º) Colete as raízes, lave-as bem, deixando totalmente livres de torrões.
- 2º) Prepare a solução 1% de anilina azul ou fucsina ácida (1 g anilina azul por 100 ml de água).
- 3º) Tome 5 mL da solução preparada e adicione a 100 mL da seguinte solução de lacto glicerol:

20 g ácido láctico

40 g glicerol (glicerina pura)

20 mL água destilada
- 4º) Coloque o lacto glicerol mais o corante para ferver.
- 5º) Após ferver, adicione as raízes e deixe por 1 a 3 minutos (Dosar o tempo de acordo com a consistência do tecido das raízes: mais tenra, menor tempo).
- 6º) Retire e lave as raízes em água corrente para retirar o excesso. Cuidado: deixar esfriar a temperatura ambiente, senão a diferença de temperatura cria bolhas no interior dos tecidos.
- 7º) Clareamento das raízes: acrescente lacto glicerol puro e deixe no balcão durante um tempo, ou colocar as raízes no lacto glicerol puro e autoclave por 10 minutos a 125 °C.
- 8º) Para montagem permanente coloque em glicerina pura e deixar no dessecador.

11.5 Referências sugeridas:

ARAÚJO, F. G. et al. Comparação Entre Técnicas de Coloração de Raízes de Soja Infectadas por *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*. **Multi-Science Journal**. Urutáí-GO, 2015. p. 100-105.

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 12: Coloração de Massas de Ovos (Ootecas) de *Meloidogyne* spp.- Método Utilizando Floxina B (TAYLOR & SASSER, 1978)

12.1. Introdução

A técnica de coloração de massas de ovos é um método usado para facilitar a visualização de ovos (ootecas) de *Meloidogyne* spp. presentes nas raízes de culturas. Com a aplicação desse método as massas de ovos aparecerão avermelhadas, facilitando sua observação e posterior contagem. As ootecas podem ser coletadas e utilizadas como inóculo.

12.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é desenvolver a coloração de massas de ovos de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* spp.

12.3. Procedimentos para realização da aula

12.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,

Água,

Béquer 1 litro,

Floxina B.

12.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

12.4 Procedimentos

1º) Lave as raízes e coloque-as em solução aquosa de floxina B (150 mg de floxina B em 1 litro de água). Deixe de molho de 15 a 20 minutos.

2º) Em seguida, lave em água corrente para remover o corante residual das raízes.

12.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.). Raleigh, North Carolina State University, N.C. 111p..

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 13: Coloração de Massas de Ovos (Ootecas) de *Meloidogyne* spp.- Método da Fucsina Ácida (SILVA et al., 1988)

13.1. Introdução

A técnica de coloração de massas de ovos é um método usado para facilitar a visualização de ovos (ootecas) de *Meloidogyne* spp. presentes nas raízes de culturas. Com a aplicação desse método as massas de ovos aparecerão avermelhadas, facilitando sua observação e posterior contagem. O presente procedimento é semelhante ao método anterior, embora com a vantagem de ser mais barato, visto que a floxina B é um corante caro e nem sempre acessível.

13.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é desenvolver a coloração de massas de ovos de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* spp. utilizando fucsina ácida.

13.3. Procedimentos para realização da aula

13.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,

Água,

Béquer 500 mL,

Fucsina ácida,

Água destilada,

Ácido acético glacial.

13.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

13.3.4 Procedimentos

1º) Lave as raízes em água corrente, em seguida no béquer adicione 30 mL de água, 1 mL de uma solução corante composta de 3,5 g de fucsina ácida, 250 mL de ácido acético glacial e 750 mL de água destilada, a frio coloque as raízes na mistura durante 5 a 10 minutos.

2º) Após decorrido o tempo necessário, retire as raízes da solução corante, deixando escorrer o excesso de corante. Examine e observe se há ootecas. Após a coloração as ootecas devem ficar avermelhadas, facilitando a sua visualização e contagem, podendo também utilizar os ovos como inóculo.

13.3.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

SILVA, G.S.; SANTOS, J.M. dos & FERRAZ, S. 1988. Novo método de coloração de ootecas de *Meloidogyne* sp. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, XII. Resumos do... Dourados, MS, 01 a 05 de fevereiro de 1988. p. 7.

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 14: Coloração de Massas de Ovos (Ootecas) de *Meloidogyne* spp.- Método Utilizando Corantes Alimentícios (ROCHA et al., 2005).

14.1. Introdução

A técnica de coloração de massas de ovos é um método usado para facilitar a visualização de ovos (ootecas) de *Meloidogyne* spp. presentes nas raízes de culturas. Com a aplicação desse método as massas de ovos aparecerão rosa- avermelhadas, facilitando sua observação e posterior contagem. O presente procedimento é semelhante aos métodos descritos anteriormente, porém se usa corantes da indústria alimentícia.

14.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é desenvolver a coloração de ovos (ootecas) de nematoide do gênero *Meloidogyne* spp. utilizando corantes da indústria alimentícia, descrito por Rocha (2005).

14.3. Procedimentos para realização da aula

14.3.1. Materiais e equipamentos

Microscópio estereoscópico,

Béquer ou copo,

Lâminas de microscopia e lamínulas,

Suco artificial contendo o corante vermelho- bordeaux.

14.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

14.3.3 Atenção!

Para fazer a coloração de ovos de *Meloidogyne* spp., siga os seguintes passos:

- 1º) Pipete um mililitro de suspensão de ovos e para 20 mL da solução corante em tubos de vidro.
- 2º) Aqueça o tubo em banho- maria a 100 °C por 2 minutos.
- 3º) Após o resfriamento em temperatura ambiente, verta a suspensão em tela Milipore de 11mm, para retirar o corante. Em seguida, recolha ovos em água e leve para observação

14.3.4 Procedimento para coloração de massas de ovos (ootecas) de *Meloidogyne* spp.:

1º) Prepare uma solução aquosa a 1% do produto comercial contendo vermelho- Bordeaux (Q. refresco[®] morango, que possui vermelho bordeaux; e a tartrazina ou Ki. Gostoso[®] groselha, que possui azul- indigotina e vermelho- Bordeaux, são exemplos.)

2º) Primeiramente prepare o sistema radicular lavando cuidadosamente por imersão em balde com água, para remover o substrato aderido, sem retirar as massas de ovos aderida,

3º) Após lavadas coloque as raízes na solução corante colocada em um béquer de 500 ml e deixe em repouso por 20 minutos.

4º) Em seguida, retire as raízes da solução e coloque-as na água por 15 minutos, para retirar o excesso de corante. Posteriormente deixe-as sobre o papel toalha por 10 minutos, para absorver o excesso de água, possibilitando a visualização das massas de ovos de *Meloidogyne* spp. coradas de rosa- avermelhado na superfície das galhas nas raízes.

14.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p.

Roteiro de Aula Prática 15: Inoculação de Nematoides- Método Para Obtenção de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio de *Meloidogyne* spp. para Infestação de Solo

15.1 Introdução

Ovos de *Meloidogyne* spp., são extraídos da superfície de galhas para servirem de inoculo em testes de hospedeiros diferenciadores de raças e para experimentos. O presente método consiste em inoculação de nematoides para obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp., para infestação de solo.

15.2 Objetivo

O objetivo da presente aula prática é obter ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp., para infestação de solo.

15.3. Procedimentos para realização da aula

15.3.1. Materiais e equipamentos

Balde d'água,

Água,

Tesoura,

NaOCl 0,5 % (Hipoclorito de sódio a 0,5%)

Vidro como de maionese com tampa,

Peneira de 200 mesh com abertura de 0,074 mm,

Peneira de 500 mesh com abertura de 0,0254 mm,

Pisseta,

Béquer,

Funil de Baermann,

Muda de uma cultura (exemplo soja).

15.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

15.4 Procedimentos

- 1º) Retire o sistema radicular do solo e mergulhe-o em balde d'água agitando levemente, para retirar o excesso de solo aderido.
- 2º) Pique as raízes e coloque-as em um recipiente fechado, como vidro de maionese com 200 mL de NaOCl 0,5%, agite vagarosamente por 2 minutos.
- 3º) Verta a suspensão em peneira de 200 mesh acoplada sobre outra de 500 mesh.
- 4º) Enxágue as raízes algumas vezes para retirar os ovos que restaram.
- 5º) Lave a peneira de 500 mesh com jatos d'água de pisseta e recolha os ovos em um copo ou béquer (HUSSEY E BARKER, 1973). Os ovos retirados nesta última peneira podem ser utilizados para infestação de solo ou transferidos para funil de Baermann, visando a obtenção de juvenis de segundo estágio (J2), para inoculação.
- 6º) Após 24 a 48 horas no funil de Baermann, os juvenis são recolhidos e a suspensão calibrada para 1.000 a 5.000 J2/mL.
- 7º) Deposite a suspensão em quatro cavidades opostas feitas ao redor da planta, cerca de 2, 3 cm distantes do caule e com 1,5 de profundidade. A infestação do vaso deve ser feita com solo nem muito seco nem encharcado. A quantidade de ovos por planta depende da finalidade do estudo.

15.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p.

Roteiro de Aula Prática 16: Inoculação de Nematoides- Método para Obtenção de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio de *Heterodera glycines* para Infestação de Solo.

16.1. Introdução

Ovos de *Heterodera glycines*, são extraídos de raízes de plantas infectadas com o nematoide do cisto da soja para servirem de inóculo em testes de hospedeiros diferenciadores de raças e para experimentos. O presente método consiste em inoculação de nematoides para obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines*, para infestação de solo.

16.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é obter ovos e juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines*, para infestação de solo.

16.3. Procedimentos para realização da aula

16.3.1. Materiais e equipamentos

Raízes de plantas infectadas,

Água,

Peneira de 20 mesh com abertura de 0,841 mm,

Peneira de 60 mesh com abertura de 0,250 mm,

Peneira de 100 mesh com abertura de 0,150 mm,

Peneira de 200 mesh com abertura de 0,074 mm,

Peneira de 500 mesh com abertura de 0,0254 mm,

Béquer,

Centrífuga,

Solução de sacarose (615 g de sacarose/litro de solução),

Funil de Baermann.

16.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

16.4 Procedimentos

1º) Lave as raízes infectadas com os nematoides do cisto da soja com água de torneira sobre uma peneira de 20 mesh acoplada a de uma de 100 mesh as fêmeas retidas na última peneira são recolhidas em um béquer .

2º) Para eliminar resíduos, centrifugue a suspensão a 420g, por 150 segundos. Elimine o sobrenadante e o precipitado ressuspendido em solução densa de sacarose (615 g de sacarose/litro de solução).

3º) Posteriormente, passe a suspensão em peneira de 100 mesh, e transfira as fêmeas retidas para um esmagador de tecidos, procedendo-se à ruptura de seus corpos.

4º) Passe novamente a suspensão em peneira de 200 mesh acoplada a uma de 500 mesh. Os ovos retirados nesta última peneira são recolhidos em um béquer e podem ser utilizados para a infestação de solo ou transferidos para funis de Baermann, para a obtenção de juvenis de segundo estágio (J2), para inoculação, assim como para *Meloidogyne* spp. Em testes de hospedeiros diferenciadores, 4.000 ovos de J2 são depositados em uma cavidade central de 1,3 cm de diâmetro com 5 cm de profundidade, logo antes do plantio de plântula de soja (RIGGS E SCHMITT, 1991).

16.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

Roteiro de Aula Prática 17: Inoculação de Nematoides - Calibração de Suspensão de Ovos de *Meloidogyne* spp. e de *Heterodera glycines* para Inoculação.

17.1 Introdução

Ovos de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines*, são extraídos de raízes de plantas infectadas com o nematoide do cisto da soja para servirem de inóculo em testes de hospedeiros diferenciadores de raças e para experimentos. O presente método consiste em inoculação de nematoides para obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* e *Heterodera glycines*, para infestação de solo.

17.2 Objetivo

O objetivo da presente aula prática é obter ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp. *Heterodera glycines*, para infestação de solo.

17.3. Procedimentos para realização da aula

17.3.1. Materiais e equipamentos

Pipeta,

Placa de Peters.

17.3.2. Normas de segurança para a aula 8 sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

17.4 Procedimentos

1º) Transfira com uma pipeta, 1,5-2 mL da suspensão de ovos para a lâmina (ou câmara) de Peters, para avaliar a concentração de ovos.

2º) A lâmina tem 24 quadrados, dispostos num volume de 1 mL. Freitas, Neves e Oliveira (2008), sugerem que para a quantificação dos ovos é contá-los nos quadrados assinalados com x (figura 17.1).

3º) Depois de contado os ovos, nos seis quadrado, é só multiplicar por 4 para obter o número de ovos de 1 mL.

4º) Recomenda-se calibrar a suspensão para 1.000 ovos/mL. No caso de *Meloidogyne* spp., aplicar 5.000 ovos/planta ou 5 mL da suspensão.

Figura: 17.1: Representação esquemática da lâmina de Peters usada para contagem usada para contagem de ovos de *Meloidogyne* spp. (FREITAS, NEVES e OLIVEIRA, 2008).

	X						
		X					X
			X		X		
				X			

Fonte: FREITAS, L. G.

17.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à Nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p.

Roteiro de Aula Prática 18: Método de Extração e Calibração de Ovos de *Meloidogyne* spp., para Uso como Inóculo em Testes de Hospedeiro Diferencial (HUSSEY; BARKER, 1973).

18.1 Introdução

O método de extração e calibração de ovos de *Meloidogyne* spp., para a preparação de inóculo descrito a seguir, segue a metodologia proposta por HUSSEY & BARKER (1973), modifica por BONETTI & FERRAZ (1981).

18.2 Objetivo

O objetivo da presente aula prática é desenvolver a extração e calibração de ovos de *Meloidogyne* spp. para uso como inóculo em testes de hospedeiro diferencial.

18.3 Procedimentos para realização da aula

18.3.1 Materiais e equipamentos

Raízes de tomateiro Santa Cruz;

Tesoura;

Liquidificador;

Hipoclorito de sódio 0,5%;

Peneira de 20 Mesh com abertura de 0,841 mm,

Peneira de 500 Mesh com abertura de 0,025 mm,

Pisseta;

Béquer 100 mL;

Bastão de vidro;

Pipeta;

Lâmina de contagem Peter;

Lâmina;

Lamínula.

18.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

18.3.3 Atenção!

Caso não se possua lâmina de contagem, pode-se fabricar placas com caixinhas de plástico transparentes e retangulares, como algumas tampas de caixa de lamínulas, para serem observadas no microscópio estereoscópico (lupa). A área da superfície dessa caixinha deve ser subdividida em frações com linhas riscadas com um estilete, isso facilitará na contagem.

18.4 Procedimentos

1º) As raízes de tomateiro Santa Cruz contendo galhas e ootecas da população monoespecífica, obtidas seguindo o métodos descrito anteriormente e cultivado durante no mínimo 60 dias, devem ser lavadas cuidadosamente para se retirar o solo aderido.

2º) As raízes devem ser picadas em pedaços de aproximadamente 2 cm de comprimento e triturados, na rotação máxima, em liquidificador contendo solução de NaCl (Hipoclorito de sódio) a 0,5%, durante 20 segundos.

3º) O resultado obtido deve ser imediatamente passado em peneira de 200 mesh, e posteriormente em peneira de 500 mesh, onde serão recolhidos os ovos.

4º) Com auxílio de uma pisseta com água remova o excesso de hipoclorito e recolha o material para um béquer. Caso essa mistura tenha ficado muito suja, com pequenos restos dos tecidos vegetais, pode-se clarificá-las usando a metodologia de Coolen & D'herde (1972).

4º) Agite a mistura com um bastão de vidro e com auxílio de pipeta recolha uma gota da mesma colocado em uma lâmina de contagem de Peters ou qualquer outra lâmina ou placa de contagem, procedendo-se a contagem do número de ovos presentes. A contagem deve ser repetida no mínimo três vezes, tomando-se a medida das três contagens.

5º) Por fim, depois de obtida a média das três contagens, multiplica-se o número de ovos pelo volume total da mistura para se determinar o número total disponível para inoculação.

Considerando-se que cada planta hospedeira diferencial deverá ser inoculada com 5000 ovos, e que no mínimo são feitas três repetições, teremos a quantidade final de ovos necessária para a inoculação.

18.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 19: Método do Teste com Hospedeiro Diferencial

19.1. Introdução

Para desenvolver o teste com hospedeiro diferencial visando à determinação da espécie e/ou raça de *Meloidogyne* spp., o mesmo deve ser conduzido com temperatura variando de 24 a 39°C, pois a reação de resistência do algodão e do fumo é dependente da temperatura. Conseqüentemente, a altas temperaturas (> 30°C), as populações de *M. incógnita* podem ser induzidas a infectar um ou ambos desses hospedeiros, e então, a raça poderá ser erroneamente identificada.

19.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é determinar a espécie ou raça de *Meloidogyne* spp. através do teste hospedeiro.

19.3. Procedimentos para realização da aula

19.3.1. Materiais e equipamentos

Mudas de plantas hospedeiras;

Bandejas;

Vasos;

Solo;

Esterco bovino estéril;

Pipetador;

Regador;

Solução de floxina B (15 mg/1litro de água);

Água.

19.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

19.4 Procedimentos

1º) Semeie em bandejas, ou outro recipiente qualquer, as plantas hospedeiro diferenciador.

2º) Quando tiverem atingido o estágio de 2 a 4 folhas totalmente desenvolvidas, transplante uma plantinha sadia para cada vaso, contendo uma mistura de solo e esterco bovino estéreis. Use no mínimo três repetições de cada cultivar diferenciadora.

3º) Pipete 5 ml (ou outro volume qualquer, conforme o calibrado) do inóculo que deve ser constantemente agitado, borbulhando-se ar com a pipeta.

4º) Despeje rapidamente os 5 mL do inóculo (contendo 1000 ovos/ml) em um orifício aberto no solo, próximo a base da planta, em cada um dos vasos.

5º) Irrigue as plantas suavemente para não lavar os ovos do solo. O excesso de água nas primeiras semanas da inoculação pode lavar o inóculo para fora do vaso.

6º) Deixe as plantas e os nematoides desenvolverem em torno de 60 dias.

Depois de encerrar o prazo de 60 dias em que as plantas inoculadas foram conduzidas em ambiente onde a temperatura não variou acima de 30°C, deve-se proceder à colheita e avaliação dos resultados como descrito a seguir:

7º) Remover a parte aérea das plantas e lavar cuidadosamente o solo do sistema radicular.

8º) Se as massas de ovos (ootecas) forem muito pequenas ou em pouca quantidade, deve-se colorir com uma solução de floxina B (15 mg/litro de água ou 0,0015%) por 15 a 20 minutos, para aumentar a visibilidade. O corante é absorvido pela matrix gelatinosa que envolve os ovos, produzindo neles uma coloração rósea a vermelha. As raízes propriamente não se colorem ou ficam apenas um pouco coloridas. Os ovos não absorvem a tinta e mantem-se viáveis.

9º) Deve-se proceder a contagem do número de galhas e do número de ooteca, separadamente, para cada sistema radicular.

10º) Para os resultados obtidos na contagem do número de galhas e ootecas, deve-se atribuir notas de 0 a 5, segundo escala proposta por Taylor & Sasser (1978), como a seguir:

Tabela 19.1: Escala para contagem de galhas e ootecas de *Meloidogyne* spp.

GRAU OU NOTA	REAÇÃO	Nº DE GALHAS E/OU OOTECAS
0	Resistente	0
1	Resistente	1-2
2	Resistente	3-10
3	Suscetível	11-30
4	Suscetível	31-100
5	Suscetível	>100

11º) As plantas hospedeiras que obtiveram média do índice de galhas ou ootecas de dois ou menos, são consideradas resistentes (-), desde que a média do cultivar de tomate 'Rutgers' (controle suscetível) tenha sido maior que 4.

12º) As plantas hospedeiro nas quais a reprodução do nematoide foi moderada a alta (isto é, aquelas com média do índice de galhas e ootecas maior que dois) devem ser consideradas suscetíveis (+).

19.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 20: Identificação de Espécie e Raça- Método para a Obtenção de População Monoespecífica de *Meloidogyne* spp. (FASSULIOTIS, 1979).

20.1 Introdução

É comum laboratórios de Nematologia receberem amostras de solo e/ou raízes, contaminadas por *Meloidogyne* spp. A identificação precisa da espécie envolvida é de extrema importância para a determinação das estratégias de controle no Programa de Manejo Integrado de Nematóide. Outro aspecto extremamente necessário é a identificação ao nível de raça fisiológica ou de raça hospedeiro. A seguir, encontram-se todos os passos necessários sobre a metodologia usual, para identificação de espécies e raças de *Meloidogyne* spp. Tais procedimentos são necessários tanto para análises de rotina como para pesquisas com o nematóide formador de galhas.

20.2 Objetivo

A presente aula prática tem o objetivo de detalhar o método de identificação do fitonematóides da espécie *Meloidogyne* spp. utilizando técnica para obtenção de população monoespecífica da espécie.

20.3 Procedimentos para realização da aula

20.3.1 Materiais e equipamentos

Raízes ou galhas com ootecas;

Ácido láctico a 45% ou solução salina a 1%;

10 vasos de argila ou de plástico 16 x 15;

10 placas de Petri 60 x 15 mm

Mudas de tomate Santa Cruz 'Kada';

20.3.2 Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

20.3.3 Atenção!

Caso se tenha somente solo com ovos e larvas, deve-se transferi-los para um recipiente (vaso de argila, plástico etc.) e transplantá-los para uma ou duas mudas de tomate do grupo Santa Cruz, cujas sementes são comumente encontradas para vender. É preciso então, esperar

no mínimo 60 dias, para depois extrair as fêmeas maduras das raízes de tomate, e proceder aos cortes perineais.

20.4 Procedimentos

1º) Retire das raízes no mínimo 10 fêmeas maduras e transfira-as para uma gota de ácido láctico a 45%, ou solução salina a 1%.

2º) Posteriormente, siga os passos para a preparação de configurações perineais até chegar ao nível da espécie.

Caso seja necessário trabalhar com uma espécie de *Meloidgyne* para fins de pesquisa, deve-se proceder segundo a metodologia para a obtenção de população monoespecífica (FASSULIOTIS, 1979), que servirá como inoculo puro, precisamente identificado, às vezes até o nível da raça.

O procedimento é o seguinte:

1º) Lave as raízes com galhas e ootecas cuidadosamente.

2º) Retire as ootecas individualmente (no mínimo 10), as quais serão mantidas em placas de petri separadas, ou seja, deve conter uma ooteca em cada placa de petri.

3º) Prepare 10 recipientes (vaso de argila ou plástico) com solo estéril, e transplante uma mudinha de tomate com aproximadamente 15 cm de altura para cada recipiente. Os vidros contendo as ootecas devem ser vertidos, um para cada solo com tomate, em orifício aberto manualmente em torno da muda.

4º) Os recipientes (10) assim preparados deverão ser mantidos, no mínimo durante 60 dias, em estufa ou em outro lugar apropriado, com irrigações normais. Após esse tempo, proceder-se-á a confirmação da espécie em cada um dos recipientes, mediante a configuração perineal.

20.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 21: Preparação de Configurações Perineais- Método para Identificação de Espécies de *Meloidogyne* spp. (HARTMAN & SASSER, 1985).

21.1 Introdução

Muitas espécies de *Meloidogyne* são morfologicamente diferentes variando suas formas e medidas. O método mais simples e barato utilizado na identificação de espécies é o corte perineal, ou configuração perineal A região caudal da fêmea, que engloba o ânus e a vulva, possui marcas cuticulares características de cada espécie. Para se determinar a espécie de uma população deve-se cortar essa região de aproximadamente 20 fêmeas e observá-las ao microscópio óptico, para determinação da espécie.

21.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é desenvolver o método descrito por Hartman & Sasser (1985) para preparação de configurações perineais para identificação de espécies de nematoide *Meloidogyne* spp.

21.3 Procedimentos para realização da aula

21.3.1 Materiais e equipamentos

Bisturi com alça nº 03 e lâmina nº15;

Pinça com ponta fina;

Duas seringas descartáveis capacidade de 1 ml, com agulha;

Ácido láctico 45%;

Glicerina pura;

Placas de Petri de plástico;

Lâmina e lamínula limpas;

Esmalte incolor;

Estilete de pescaria;

21.3.2 Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

21.4 Procedimentos

1º) Selecione galhas com fêmeas maduras. Coloque-as em placas de Petri pequena ou vidro de Siracusa (vidro com acabamento em metal) mantendo-as úmida (não deixe secar), e leve para

o microscópio estereoscópio (lupa). Galhas com uma fêmea presente são preferíveis a galhas compostas.

2º) Remova as fêmeas uma a uma (no mínimo 10 fêmeas) com o auxílio das agulhas, das duas seringas de 1 ml. Coloque as fêmeas em uma gota de ácido láctico na placa de Petri de plástico.

3º) Corte o pescoço da fêmea e esprema devagar para sair um pouco do conteúdo do corpo.

4º) Corte as fêmeas pela metade, transversalmente. Limpe o interior do corpo espremendo-as cuidadosamente em uma gota de ácido láctico.

5º) Corte novamente a região perineal até que ela se torne quadrada. Cuidado para não cortar muito próximo. Prepare no mínimo 10 cortes perineais.

6º) Transfira um por um dos cortes prontos para uma pequena gota de glicerina, na lâmina.

7º) Com o estilete de pescaria, posicione no fundo da gota os cortes perineais pressione-os levemente e enfileire-os corretamente, para facilitar a observação no microscópio. Coloque no mínimo 10 cortes perineais por lâmina.

8º) Coloque a lamínula cuidadosamente, com o auxílio do estilete de pescaria. Sele com esmalte incolor.

9º) Prepare duas etiquetas, identificando corretamente cada lâmina preparada com: data, local, cultura, nº de cortes, e espécies identificadas.

21.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 22: Preparo de Lâminas- Método Para Preparo de Lâminas Temporárias com Espécimes de Nematoides (COBB, 1918).

22.1 Introdução

Existem várias técnicas para montagem de lâminas de nematoides. A identificação rápida com propósito de diagnóstico requer a confecção de lâminas temporárias em água contendo espécimes de nematoides.

22.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é preparar lâminas temporárias para observação e identificação de espécimes de nematoides

22.3. Procedimentos para realização da aula

22.3.1. Materiais e equipamentos

Microscópio estereoscópio;

Estilete com ponta bem fina;

Placa de Petri pequena (5 cm de diâmetro);

Lâmina;

Lamínula;

Esmalte incolor, base para unhas ou parafinas;

Caneta para retroprojeter ou etiquetas;

Lamparina a álcool ou vela.

22.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

22.3.3 Atenção!

Para se obter um bom estilete, com a ponta o mais fina possível pode-se fazê-lo com farpa de bambu, ou o que é mais indicado, com agulhas descartáveis. Para deixá-las com a ponta bem fina basta lixar a ponta usando “lixa de água”, a mais fina existente.

22.4 Procedimentos

1º) Coloque a suspensão obtida em tudo de ensaio e deixe decantar por peça menos 30 minutos. Após esse tempo e com o auxílio de uma mangueira fina (tubo de soro fisiológico), drene o excesso de água, ficando os nematoides concentrados.

2º) Verta essa suspensão em uma placa de contagem, para identificação dos nematoides a qual deverá ser feita em microscópio.

3º) Por meio de estilete de pesca (fino), transfira os espécimes para uma pequena gota de água limpa colocada no centro de uma lâmina nova.

4º) Disponha os nematoides no centro e no fundo da gota paralelamente e tão juntos quanto possível. Passe a lâmina de 2-3 vezes sobre a chama uma lamparina, para matar os nematoides. Normalmente, nematoides mortos ficam esticados e *Helicotylenchus* spp., espiralados.

5º) Firme a lamínula na posição com 3-4 pequenas gotas de esmalte de unha. Deixe que sequem e sele completamente a lâmina.

6) Etiquete conforme convém.

22.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 23: Preparo de Lâminas- Método para Montagem de Lâminas Permanente em Glicerina (BAKER, 1953)

Após obter a suspensão contendo os nematoides, através de alguns dos métodos de extração descritos anteriormente, os mesmos devem ser mortos pelo calor em banho maria com água a 55 °C por 5 minutos e posteriormente fixados. Algumas soluções fixadoras são:

- Formalina 4%: 10 mL de formalina (formaldeído 40%), 90 mL de água destilada e 100 g/L de carbonato de cálcio.
- Formalina- Ácido acético: 10 mL de formalina (formaldeído 40%), 1 mL de ácido acético glacial e 89 mL de água destilada.
- Formalina- Glicerina: 10 mL de formalina (formaldeído 40%), 1 mL de glicerina e 89 mL de água destilada.

Deve-se adicionar um pouco de carbonato de cálcio (100 g/L) nas soluções para que não ocorram o escurecimento do nematoides a formação de grânulo. Os nematoides podem ser preservados nessas soluções durante anos, em vidros vedados.

23.1 Introdução

Existem muitos métodos para montagem de lâminas permanentes de nematoides, e na grande maioria desses métodos são usados álcool e glicerina, obtendo-se, bons exemplos de nematoides para estudos taxonômicos. Na presente aula prática será descrito o método Baker (1953) utilizado rotineiramente nos laboratórios de Nematologia.

23.2 Objetivos

O objetivo da presente aula prática é preparar lâminas permanentes para estudos taxonômicos de nematoides seguindo o método de Baker (1953).

23.3. Procedimentos para realização da aula

23.3.1. Materiais e equipamentos

Microscópio estereoscópio;

Glicerina;

Álcool 30%;

Estilete de ponta bem fina;

Dessecador contendo sílica-gel;

Placa de Petri de vidro pequena (5 cm de diâmetro);

Lâmina de microscopia e lamínulas;

Parafina.

23.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

23.4 Procedimentos

1º) Transfira os nematoides para a solução fixadora, com o auxílio de uma estilete de ponta fina, para uma série de soluções mantidas a 55 °C, permanecendo por aproximadamente 10 minutos em cada passo.

2º) Após a última solução os nematoides devem ser montados imediatamente em glicerina pura ou em um dessecador com sílica- gel, para que se complete a desidratação, durante um curto período de tempo.

3º) Coloque os nematoides em uma gota de glicerina desidratada sobre a lâmina, cobertos com uma lamínula.

4º) Sele as bordas da lamínula usando tiras de parafina ao redor da gota da glicerina.

5º) Derreta a parafina aquecendo a lâmina em uma chapa quente, com cuidado para não aquecer muito e deformar os nematoides. A composição das soluções está descrita na **Tabela 17.1**.

Figura 23.1: Tabela de Soluções, em mL, empregadas no preparo de lâminas permanentes (método de Baker, 1953).

Soluções (mL)					
	1	2	3	4	5
Glicerina	55,0	70,0	82,0	90,0	100,0
Ácido láctico	15,0	10,0	5,0	2,5	0
Fenol	15,0	10,0	5,0	2,5	0
Água destilada	10,0	5,0	5,0	2,5	0
Formaldeído 40%	5,0	5,0	3,0	2,5	0

Autor: Dimitry Thihid

23.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

Roteiro de Aula Prática 24: Preparo de Lâminas- Método para Preparo de Lâminas Permanentes (SEINHORST, 1959)

24.1. Introdução

Existem muitos métodos para montagem de lâminas permanentes de nematoides, e na grande maioria desses métodos são usados álcool e glicerina, obtendo-se, bons exemplos de nematoides para estudos taxonômicos. Na presente aula prática será descrito o método de Seinhorst (1959).

24.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é preparar lâminas permanentes para estudos taxonômicos de nematoides seguindo o método de Seinhorst (1953).

24.3. Procedimentos para realização da aula

24.3.1. Materiais e equipamentos

Microscópio estereoscópio;

Glicerina;

Álcool 96%;

Água destilada;

Estilete de ponta bem fina;

Dessecador contendo sílica- gel;

Placa de Petri;

Lâminas de microscopia e lamínulas;

Parafina.

24.3.2. Normas de segurança para a aula sugestões para consolidação da prática

Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

24.3.3 Atenção!

Para o desenvolvimento deste método é necessário ter as seguintes soluções estoque:

Solução I: 20 partes de álcool 96%, 01 partes de glicerina e 79 partes de água destilada

Solução II: 95 partes de álcool 96% e 05 partes de glicerina

24.4 Procedimentos

1º) Pesque os nematoides da solução fixadora com auxílio de um estilete de ponta fina e transfira-os para uma placa de Petri com a solução I.

2º) Esse recipiente é, então transferido para um dessecador e colocado em uma estufa com temperatura ajustada entre 35 e 40 °C durante 12h.

3º) Após esse período, o recipiente é colocado sob microscópio estereoscópio, de onde, com o auxílio de uma seringa com agulha fina, retira-se o restante da solução.

4º) Complete o volume com até quase o topo do recipiente com uma solução de 95 partes de álcool 96% e cinco partes de glicerina.

5º) Coloque o recipiente em uma Placa de Petri parcialmente fechada e transfira para a estufa com temperatura entre 35 e 40 °C por um período de 3 horas. Durante esse processo o álcool e evaporado e os nematoides ficam embebidos em glicerol puro.

6º) O recipiente deve ser mantido em um dessecador contendo sílica- gel até o momento da montagem das lâminas, para que não ocorra a reabsorção de água. Em seguida monte as lâminas como já descrito anteriormente.

24.5 Referências sugeridas:

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensino de Nematologia, seja ele no nível médio ou no nível superior, é um grande desafio tanto para professores, quanto para os alunos, pois a maior dificuldade dos educandos está exatamente no caráter abstrato que os nematoides apresentam, uma vez que se trata de animais geralmente microscópicos e translúcidos. Já no que tange aos professores, o desafio está em como trabalhar os conteúdos apesar das dificuldades que o ensino de Nematologia enfrenta.

A realização de práticas laboratoriais sobre a temática nas aulas de biologia e em cursos superiores como engenharia agrônoma é de suma importância, pois se tratando de animais que muitas vezes passam despercebidos, os nematoides são muito frequentes no ataque de culturas, acarretando em sérios danos e prejuízos financeiros ao agricultor e consequentemente a economia mundial.

O presente trabalho trouxe a descrição de 24 métodos de aulas práticas de nematologia, apresentando os principais métodos de extração, coleta identificação e coloração de nematoides que auxiliará vislumbrar o cenário de aulas expositivas dialogadas intercaladas com aulas práticas laboratoriais, de forma que o conhecimento empírico seja testado e argumentado além de tornar possível a exploração de um ambiente com um caráter mais informal que o laboratório proporciona, sendo positivo para a construção de novas ideias e concepções.

Materiais didáticos contendo métodos práticos de nematologia são raros na literatura e muitas vezes não são acessíveis em todas as bibliotecas e bancos de dados, o que demonstra a importância do desenvolvimento e publicação de trabalhos nesse âmbito. A futura edição e ampla distribuição gratuita desse material em formato de livro, como material didático e de apoio ao professor, poderá auxiliar na melhoria do ensino de Nematologia, pois além de contribuir com a comunidade científica, auxiliará tanto professores de biologia do ensino médio, quanto alunos e professores do ensino superior, principalmente os envolvidos nos cursos de agronomia e áreas afins.

5. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. G. et al. Comparação Entre Técnicas de Coloração de Raízes de Soja Infectadas por *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*. **Multi-Science Journal**. Urutaí-GO, 2015. p. 100-105.
- ARRUDA, S. M.; LABURÚ, C. E. Considerações sobre a função do experimento no ensino de Ciências. In: NARDI, R. (Org.). *Questões atuais no ensino de Ciências*. São Paulo: Escrituras, 1998. p. 53-60.
- BAERMANN, G. 1917. Eine Einfache Methode Zur Auffindung Von Ankvlostomum (nematoden) Larven in Erdproben. *Tijdschr. Ned.-Indie* 57:131-137.
- 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
- BIGNALL, D. E. (Ed.). **A hand book of tropical soil biology: ampling and characterization of below-ground biodiversity**. London: Earthscan, 2008. p. 97-106.
- BORGES, A.T et al. Metodologias e práticas docentes: uma reflexão acerca das aulas práticas no processo de ensino aprendizagem de biologia. **Revista Experiências em Ensino de Ciências**, Mato Grosso, v.10, n. 2. p.14-25 2015.
- BONGERS, T; FERRIS, H. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. **Trends in Ecology and Evolution**, v.14, p. 224-228, 1999.
- BRASIL. Secretaria da Educação Fundamental. *Parâmetros Curriculares Nacionais: Ciências Naturais*. Secretaria de Educação Fundamental. Brasília: MEC/SEF, 1998.
- BYRD, Jr., D.W; KIRKPATRICK, J. & BARKER, K.R, 1983. Na improved technique for clearing and staining planttissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15 (1) : 142-143.
- CAPELETTO, A. *Biologia e Educação ambiental: Roteiros de trabalho*. São Paulo: Ática, 1992.
- CARES, J. E.; HUANG, S. P. Soilnematodes. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.;

- COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agricultural Research Centre-GHENT, Belgium. 77 p.
- COYNE, D.L., NICOL, J.M. and CLAUDIUS-COLE, B. 2007. Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin
- EISENBACK, J. D. Morphology and systematics. In: BARTELS, J. M. (Ed.). Plant and nematode interactions. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p. 37-63, 1998.
- FASSULIOTIS, G. 1979. Plantbreeding for root-knot nematode resistance. In: LAMBERT, F. & TAYLOR, C. E. ed. Root-Knot Nematode (*Meloidogyne species*). Systematics, Biology and Control. London, Academic Press, p. 425-53.
- FERRAZ, C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 168-201.
- FERRAZ, L.C.C.B. O nematoide *Pratylenchus brachyurus* a soja sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, v.96, p.23-27, 2006.
- FRACALANZA, H. et al. O Ensino de Ciências no 1º grau. São Paulo: Atual. 1986. p.124.
- FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).
- JENKINS, W.R. Nematodes associated with lemon grass in Guatemala. In: Symposium on tropical nematology, 1967, Puerto Rico. Proceedings. Puerto Rico: University of Puerto Rico, 1969, p.80-83.
- HARTMAN, K.M. & SASSER, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne species* on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: Na Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume II. Methodology. Barker, K.R., Carter, C.C. & Sasser, J.N. eds. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, p. 69-77.
- HODSON, D. Mini-special issue: taking practical work beyond the laboratory. **International Journal of Science Education**, v.20, n.6, p. 629-632, 1998.
- HODSON, H. Experimentos em ciência e no ensino de ciências. Belo Horizonte: CECIMIG. 1996. (Circulação interna). Traduzido de: Experiments in science and science teaching.

Educational Philosophy and Theory, 20 (2), 53-66. Tradutor Johana A. E. de Knecht López de Prado.

HUGOT, J.P.; BAUJARD, P.; MORAND, S. **Biodiversity in helminthes and nematodes as a field study: an overview**. Nematology, Leiden, v. 3, p. 199-208, 2001.

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

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

MORAES, R. **O significado da experimentação numa abordagem construtivista: O caso do ensino de ciências**. In: BORGES, R. M. R.; MORAES, R. (Org.) Educação em Ciências nas séries iniciais. Porto Alegre: Sagra Luzzato. 1998. p. 29-45.

MOREIRA, M.A. A teoria do desenvolvimento cognitivo de Piaget. In: MOREIRA, M.A. Teorias de aprendizagem. São Paulo: EPU. 199. p.95-107.

NOVARETTI, W.R. T. Coleta De Amostras De Raízes E Solo Para Análise Nematológica. 1. ed. Campinas-SP, 2011. 31p.

POSSOBOM, Clivia Carolina Fiorilo; OKADA, Fatima Kazue; DINIZ, Renato Eugênio da Silva. **Atividades Práticas De Laboratório No Ensino de Biologia e de Ciências: Relato De Uma Experiência**. Portal da UNESP, p. 113-123, 2002. Disponível em: < <http://www.unesp.br/prograd/PDFNE2002/atividadespraticas.pdf> >. Acesso em: 02 jun. 2018.

SASSER, J. N. (Ed.). **an advanced treatise on Meloidogyne: II. Methodology**. Raleigh: North Carolina State University/USAID, 1985. p. 3-17.

SEINHORST, J.W. 1964. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to a hydrous glycerine. Nematologica, 4:67-69.

SILVA, G.S.da; SANTOS, J.M. dos & FERRAZ, S. 1988. Novo método de coloração de ootecas de *Meloidogynesp*. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, XII. Resumos do... Dourados, MS, 01 a 05 de fevereiro de 1988. P. 7.

SOARES, P. L. M.; BARBOSA, B. F. F.; BECARO, C. K.; GIMENES, R.; FERRAZ, M. P. S.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, J. C.; MÚSCARI, A. M. **Estudo do controle biológico de *Meloidogyne incognita* na produção comercial de pimentão CV. 'Margarita' em ambiente**

protegido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 26., 2006, Rio de Janeiro. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2006. p. 65. Resumo 18.

SOUZA, R.M., E.E. Del Valle & R.M.G. Silva. 2012. O *status* do ensino de Nematologia nos cursos de Agronomia e Engenharia Agrônômica no Brasil.

TARJAN A.C. 1960. A comparison of polyethylene e plastic bags and glassjars as incubation chambers of obtaining nematodes from roots. *Plant Disease Report*, 44:574-577.

TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne sp.*). Raleigh, North Carolina State University, N.C. 111p..

TIHOHOD, Dimitry. Nematologia Agrícola. In: __. Métodos de Coleta de Amostras de Solo e Raízes para Análises. 1. ed. Jaboticabal, FCAV, 1989. cap.1, p. 28-33.

TROJAN, Daiane Garabeli; VAZ, Lucas Solek Barreto. **metodologias para estudo e diagnóstico de nematóides parasitas de plantas de brasil.** in: convibra 2014 on line conference, 2014. conference proceedings 2014, 2014. (anais de congresso).

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

YANG, B.; EISENBACK, J. D. (1983).*Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root – knot nematode parasitis in gpacaraearpod tree in China *Journal of Nematology*, 15, 381-391.

YEATES, G. W.; COLEMAN, D.C. Role ofnematodes in decomposition. In: FRECKMAN, D. W. (Ed.). **Nematodes in soilecosystems.** Austin: Universityof Texas Press, 1982. p. 55-80.

YOUNG, T. W. 1954. Na incubation methon for collecting migratory end o parasite ic nematodes. *Plant Disease Reporter*, 38:794-795.

LIMA, M. METODO de Decantação Peneiramento e Funil de Baerman High quality and size. Direção de Milton Lima. Urutaí-GO: Instituto Federal Goiano, 2011. Color. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=ClOoxU75BcE>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

LIMA, M. TÉCNICAS de extração de nematoides. Direção de Milton Lima. Produção de Danilo Messias. Urutaí-GO: Instituto Federal Goiano, 2011. Color. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=kuyIH-tJcoQ>>. Acesso em: 31 jul. 2018.