



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS MORRINHOS
CURSO BACHARELADO EM AGRONOMIA

GUIA DE AULAS PRÁTICAS DE NEMATOLOGIA

Samuel Francisco Vieira

MORRINHOS/GOIÁS

JUNHO de 2025

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS MORRINHOS

GUIA DE AULAS PRÁTICAS DE NEMATOLOGIA

Samuel Francisco Vieira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo pelo Instituto Federal Goiano,
Campus Morrinhos, sob a orientação do Prof.
Dr. Rodrigo Vieira da Silva.

MORRINHOS/GOIÁS
JUNHO de 2025

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

V657g Vieira, Samuel Francisco.

Guia de aulas práticas de Nematologia. / Samuel Francisco Vieira. –
Morrinhos, GO: IF Goiano, 2025.

66 f. : il. color.

Orientador: Dr. Rodrigo Vieira da Silva.

Coorientadora: Ma. Gabriela Araujo Martins.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Instituto Federal Goiano
Campus Morrinhos, Bacharelado em Agronomia, 2025.

1. Agronomia. 2. Ensino. 3. Material didático. 4. Nematologia. I. Silva,
Rodrigo Vieira da. II. Martins, Gabriela Araujo. III. Instituto Federal
Goiano. IV. Título.

CDU 595.132:373.6

Fonte: Elaborado pela Bibliotecária-documentalista Morgana Guimarães, CRB1/2837

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- ☐ Tese (doutorado)
☐ Dissertação (mestrado)
☐ Monografia (especialização)
☒ TCC (graduação)

- ☐ Artigo científico
☐ Capítulo de livro
☐ Livro
☐ Trabalho apresentado em evento

☐ Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Samuel Francisco Vieira

Matrícula:

2017104220210362

Título do trabalho:

Guia de Aulas Práticas de Nematologia

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: ☒ Não ☐ Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: / /

O documento está sujeito a registro de patente? ☐ Sim ☒ Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? ☒ Sim ☐ Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.



Documento assinado digitalmente
SAMUEL FRANCISCO VIEIRA
Data: 25/08/2025 09:08:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Morrinhos

Local

30/06/2025

Data

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:



Documento assinado digitalmente
RODRIGO VIEIRA DA SILVA
Data: 23/08/2025 21:28:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA INSTITUTO
FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 56/2025 - CCEG-MO/CEG-MO/DE-MO/CMPMHOS/IFGOIANO

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos trinta dias do mês de junho do ano **2025**, no auditório da Informática do Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos reuniram-se as 14:00 h, a Banca de Avaliação do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). A mesma, composta pelo professor **Dr. Rodrigo Vieira da Silva**, a **prof. Dra. Alessandra Cristina Tomé** e a **pesquisadora Ma. Gabriela Araujo Martins**, sob a presidência do primeiro, para avaliar o Trabalho de Conclusão de Curso do discente **Samuel Francisco Vieira** intitulado “**GUIA DE AULAS PRÁTICAS DE NEMATOLOGIA**”. Requisito parcial para a obtenção do título de BACHAREL EM AGRONOMIA. Ao iniciar os trabalhos, o presidente da Banca Avaliadora cedeu o tempo regulamentar para que a discente fizesse a apresentação do seu trabalho, a seguir ocorreu a arguição dos Membros da Banca de Avaliação. Na terceira etapa a banca avaliou o desempenho da estudante.

Concluído essas etapas o trabalho foi considerado:

x	Aprovado	NOTA	9,0
	Aprovado com ressalvas		
	Reprovado		

Prof. Dr. Rodrigo Vieira da Silva

Orientador - IF Goiano, Campus Morrinhos, GO

Prof. Dra. Alessandra Cristina Tomé

Membro - IF Goiano, Campus Morrinhos, GO

Pesquisadora Ma. Gabriela Araujo Martins

Membro - IF Goiano, Campus Morrinhos, GO

Documento assinado eletronicamente por:

- **Rodrigo Vieira da Silva, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 02/07/2025 11:02:45.
- **Gabriela Araujo Martins, 2022104330440008 - Discente**, em 02/07/2025 11:53:25.
- **Alessandra Cristina Tome, TECNICO EM ALIMENTOS E LATICINIOS**, em 02/07/2025 16:44:59.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 02/07/2025. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 722109

Código de Autenticação: d0e050be2e



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Morrinhos

Rodovia BR-153, Km 633, Zona Rural, SN, Zona Rural, MORRINHOS / GO, CEP 75650-000

(64) 3413-7900

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, que sempre me conduziu e fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos.

A essa instituição de ensino, essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso.

Aos professores, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado. Principalmente ao meu orientador, Rodrigo, por ter acreditado em mim e pelo apoio contínuo ao meu estudo.

Aos meus pais, Adriana e João Batista, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando nas horas mais difíceis e comemorando cada pequena vitória.

Ao meu avô Valdim Francisco (*in memoriam*) com todo o meu amor e dedicação, ao qual o sonho era me ver formado.

A minha noiva, Maria Fernanda, que nunca me recusou amor, apoio e incentivo para a realização 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 - Esquema de divisão de uma propriedade em glebas ou talhões a serem amostrados	19
Figura 1.2 - Exemplos de esquemas de amostragem de solo para análise de nematoides	20
Figura 1.3 - Procedimento de coleta de amostra de solo para análise nematológica	20
Figura 2.1 - Técnica do Funil de <i>Baermann</i> utilizada para a extração de nematoides do solo	23
Figura 3.1 - Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose descrito por Jenkins (1964)	27
Figura 4.1 - Método de extração de nematoides de tecidos vegetais por trituração seguida de flotação e centrifugação (Coolen & D' Herde, 1972)	31
Figura 5.1 - Nematóide de cisto da soja <i>Heterodera glycines</i>	33
Figura 5.2 - Extração de cisto <i>Heterodera glycines</i>	35
Figura 6.1 - Método de borbulhamento para extração de nematóide de parte aérea	40
Figura 7.1 – Coloração de raízes	44
Figura 8.1 - Sintomatologia Radicular de Plantas Hospedeiras Infectadas por Nematoides das Galhas (<i>Meloidogyne</i> spp.)	46
Figura 9.1 – Nematóide de galhas, <i>Meloidogyne javanica</i>	48
Figura 9.2 – Passo a passo do método de Boneti e Ferraz (1981)	51
Figura 9.3 – Processo de inoculação do nematóide do gênero <i>Meloidogyne</i> em mudas de jiloeiro e tomate	52
Figura: 10.1 - Representação esquemática da lâmina de Peters usada para contagem de ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. (Freitas, Neves, Oliveira, 2008)	56
Figura 11.1 - Diagrama ilustrativo do preparo de lâminas perineais de nematoides de galhas	59
Figura 11.2 - Configuração Perineal de <i>Meloidogyne incognita</i>	60
Figura. 12.1 - Materiais utilizados no preparo de lâminas temporárias com espécimes de nematoides, conforme o método de Cobb (1918)	63
Figura 12.2 - Etapas do método de Cobb (1918) para o preparo de lâminas temporárias com espécimes de nematoides, incluindo manipulação, observação e transferência para lâminas	63
Figura 12.3 – Nematóide fitopatogênico com as suas principais estruturas	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4. ROTEIROS DE AULAS PRÁTICAS	
Aula Prática 1: Métodos de Amostragem e Coleta de Solo e Raízes para Identificação de Nematoides	15
Aula Prática 2: Extração de Nematoides de Solo - Método do Funil de Baermann...	22
Aula Prática 3: Extração de Nematoides de Solo – Método da Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose	25
Aula Prática 4: Extração de Nematoides de Raízes - Método do Liquidificador e Centrifugação com Solução de Sacarose e Caulim	29
Aula Prática 5: Extração de Cisto de Nematode de Solo- Método para Extração de Cistos de <i>Heterodera glycines</i> a partir de Solo Úmido Utilizando solução de Sacarose Densa	33
Aula Prática 6: Extração de Nematoides de Partes aéreas de Plantas	38
Aula Prática 7: Coloração de Nematoides em Tecidos de Plantas - Método da Fucsina Ácida	42
Aula Prática 8: Coloração de Massas de Ovos (Ootecas) de <i>Meloidogyne</i> spp. - Método da Fucsina Ácida	45
Aula Prática 9: Método de extração de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne</i> spp. para infestação de solo.	48
Aula Prática 10: Método para obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Heterodera glycines</i> para infestação de solo (Calibração e Inoculação)	54
Aula Prática 11: Preparação de Configurações Perineais - Método para Identificação de Espécies de <i>Meloidogyne</i>	57
Aula Prática 12: Preparo de Lâminas- Método Para Preparo de Lâminas Temporárias com Espécimes de Nematoides	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	66

RESUMO

Os nematoides são organismos amplamente distribuídos na biosfera, com impacto significativo nos ecossistemas biológicos. Merecem destaque especial os fitonematoides, pois afetam a maioria das culturas de interesse econômico, causando grandes perdas financeiras. Apesar da importância do tema, a área do ensino em Nematologia Agrícola dispõe de poucos materiais didáticos de metodologias práticas específicas. Diante desse cenário, este trabalho teve como objetivo principal a elaboração de um caderno de aulas práticas de fitonematoides, com o intuito de auxiliar os professores e estudantes do ensino médio, superior, pós-graduação e profissionais de Agronomia e áreas afins. Este manual apresenta uma série de roteiros práticos que abordam técnicas de amostragem, extração e identificação de nematoides, além de métodos de coloração e inoculação, permitindo uma abordagem mais interessante, dinâmica e aplicada na área de fitonematoides. A estrutura do trabalho envolveu uma revisão teórica sobre nematoides, além da utilização do acervo de imagens, construído ao longo de mais de 25 anos do professor de Nematologia do IF Goiano, o Dr. Rodrigo Silva. Assim, realizou-se a elaboração de procedimentos laboratoriais ilustrados e de fácil aplicação. O desenvolvimento desse material irá preencher uma lacuna na formação acadêmica e contribuir para a qualificação de futuros profissionais capazes de lidar melhor com a Nematologia e o manejo integrado de fitonematoides.

Palavras-chave: Ensino, metodologia ativa, material didático, nematologia, agronomia.

ABSTRACT

Nematodes are organisms widely distributed in the biosphere, with a significant impact on biological ecosystems. Phytonematodes deserve special mention, as they affect most crops of economic interest, causing great financial losses. Despite the importance of the subject, the area of teaching in Agricultural Nematology has few teaching materials with specific practical methodologies. Given this scenario, the main objective of this work was to prepare a notebook of practical classes on phytonematodes, with the aim of assisting teachers and students at high school, college, postgraduate and professionals in Agronomy and related areas. This manual presents a series of practical guides that address sampling, extraction and identification techniques of nematodes, as well as staining and inoculation methods, allowing a more interesting, dynamic and applied approach in phytonematodes. The structure of the work involved a theoretical review on nematodes, in addition to the use of the image collection, built over more than 25 years by the professor of Nematology at IF Goiano, Dr. Rodrigo Silva. Thus, illustrated and easy-to-apply laboratory procedures were developed. The development of this material will fill a gap in academic training and contribute to the qualification of future professionals capable of better dealing with Nematology and the integrated management of plant nematodes.

Keywords: Teaching, active methodology, teaching material, nematology, agronomy.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides são patógenos de grande relevância para a agricultura brasileira e mundial. Estes organismos causam danos, especialmente nas raízes, comprometendo a absorção de água e nutrientes, o que resulta em plantas com baixa produtividade. Esses impactos se tornam ainda mais graves devido ao monocultivo e ao uso intensivo do solo. O plantio de variedades suscetíveis, associado a temperaturas elevadas e ao estresse hídrico, agrava os prejuízos causados por esses patógenos. Em culturas cuja parte economicamente relevante são raízes e tubérculos, as perdas tendem a ser ainda mais expressivas. Além disso, plantas afetadas por nematoides costumam ficar mais vulneráveis ao ataque de outras pragas e microrganismos fitopatogênicos. Devido aos prejuízos significativos que esses organismos provocam em diversas lavouras, o seu manejo adequado é fundamental para garantir a produtividade nas próximas safras (Zamboni, 2019).

Os nematoides, pertencem ao reino animal e filo Nematoda. Estes são organismos multicelulares não segmentados, com corpo cilíndrico e alongado, revestido por uma cutícula flexível e resistente. Apesar da ausência de sistemas circulatório e respiratório, possuem sistemas digestório, reprodutor, excretor e nervoso, além de músculos que possibilitam sua movimentação. Apresentam dimorfismo sexual, com fêmeas com formato globosas e menos móveis do que os machos. Seu ciclo de vida compreende estádios juvenis que passam por quatro ecdises antes da fase adulta. O ciclo de vida dos nematoides fitoparasitas inicia-se com os ovos, dos quais emerge o juvenil de segundo estágio (J2), estágio infectante que se movimenta no solo até penetrar nas raízes da planta hospedeira. Antes disso, ainda dentro do ovo, ocorre a primeira muda, do juvenil de primeiro estágio (J1) para o J2. Após a infecção, o nematoide passa por mais duas mudas (J3 e J4) até atingir a fase adulta. As fêmeas adultas, geralmente sedentárias, depositam novos ovos, reiniciando o ciclo. Em condições favoráveis, como em climas tropicais, o ciclo completo pode durar de 20 a 30 dias, variando em forma e tamanho entre as espécies. A reprodução pode ocorrer por anfigimixia, partenogênese ou, raramente, hermafroditismo (Trojan, 2011; Ferraz, Brown, 2016).

No contexto agrícola, os fitonemátoides representam uma ameaça significativa, comprometendo a produtividade e a qualidade agrícola, pois estes vermes prejudicam a absorção de água e nutrientes pelas raízes. Aproximadamente 15% das espécies descritas de nematoides são parasitas de plantas, destacando-se gêneros como *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Ditylenchus*, *Radopholus*, *Aphelenchoides*, *Helicotylenchus*, *Xiphinema*, *Longidorus* e *Rotylenchulus* *Helicotylenchus* (Ferraz, Brown, 2016). O impacto desses organismos é mais severo em solos arenosos, em regiões de climas quentes e úmidos, com temperaturas ideais entre 25 e 30 °C, favorecendo sua reprodução e disseminação (Trojan, 2011).

Diante dos prejuízos causados pelos fitonematoides, a pesquisa científica tem avançado em diversas áreas, como biologia, ecologia, genética e manejo integrado. No Brasil, o Cadastro de Líderes de Estudo de Pesquisa em Nematologia registra 40 pesquisadores atuantes nesse campo, refletindo o esforço para minimizar os danos causados por esses parasitas (SBN, 2024). Entretanto, o ensino da nematologia ainda enfrenta desafios, como a escassez de materiais didáticos e a necessidade de maior investimento na formação acadêmica.

A qualidade do ensino de Nematologia já era uma preocupação mencionada por Cobb em 1929 (Souza, Del Valle, Silva, 2012). Estudos indicam dificuldades na preparação de aulas práticas, atualização de conteúdos e infraestrutura inadequada nas instituições de ensino. Contudo, atividades laboratoriais podem ser conduzidas com recursos acessíveis e adaptáveis à realidade de cada instituição, conforme proposto por Capeletto (1992). A realização de aulas práticas, além de despertar o interesse dos alunos, permite uma melhor compreensão da estrutura e do comportamento dos nematoides, aproximando o ensino teórico da aplicação prática (Borges, 2002).

Considerando estes desafios, Souza, Del Valle, Silva (2012) sugerem a criação e distribuição gratuita de e-books como material didático, facilitando o acesso ao conhecimento sobre nematologia em diferentes níveis de ensino. A carência de materiais didáticos específicos reforça a importância do desenvolvimento de novas publicações acessíveis.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a elaboração de um guia, com roteiros de aulas práticas de Nematologia Agrícola. De modo, a ser um referencial para professores e estudantes do ensino médio, superior e pós-graduação, especialmente em cursos de agronomia e áreas semelhantes. Este guia contempla métodos práticos fundamentais para o estudo e manejo de fitonematoides, contribuindo para a formação acadêmica e profissional na área.

A importância desse trabalho está na necessidade de fortalecer o ensino e a pesquisa em Nematologia Agrícola, promovendo a capacitação de profissionais aptos a identificar, monitorar e controlar fitonematoides de forma eficiente. Com o avanço das técnicas moleculares e genômicas, o entendimento sobre a biologia e ecologia desses organismos tem se ampliado, possibilitando novas abordagens para mitigação dos impactos na agricultura. Além disso, a disseminação de materiais didáticos acessíveis pode incentivar um maior interesse pela área, contribuindo para a formação de novos especialistas e o desenvolvimento de estratégias sustentáveis para o manejo de nematoides em diferentes culturas agrícolas. Portanto, este guia visa preencher lacunas no ensino e auxiliar professores e profissionais da Nematologia na preparação e condução de aulas práticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Organizar um guia de aulas práticas de nematologia para auxiliar estudantes,

professores e profissionais da área de agronomia e afins.

2.2. Objetivos específicos

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

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a confecção do presente material didático de aulas práticas de nematologia, foram elaborados 13 roteiros de aulas práticas ilustradas. Estes foram construídos baseando-se em pesquisas bibliográficas, sites de domínio público, livros e artigos científicos e no acervo pessoal, de mais de 25 anos, do professor Dr. Rodrigo Silva do IF Goiano – Campus Morrinhos.

O presente material aborda os seguintes métodos: coleta de amostras de solo, extração de nematoides de solo, extração de nematoides de raízes, extração de nematoides da parte aérea de plantas, coloração de nematoides em tecidos de plantas, coloração de massas de ovos de *Meloidogyne* spp., inoculação de nematoides, método de identificação de espécies e métodos de preparo de lâminas temporárias para identificação dos fitonematoídes.

Cada roteiro de aula prática é composto por uma breve introdução e a sua importância, o objetivo que será alcançado com a sua aplicação, 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.

Aula prática 1 - Métodos de amostragem e coleta de solo e raízes para identificação de nematoides

1.1 Introdução

A identificação precisa de um nematoide no laboratório depende da amostragem realizada de maneira correta e da qualidade das amostras de solo e raízes que serão coletadas. Portanto, essas amostras devem receber especial atenção, devendo ser coletadas corretamente e, enviadas para análise 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 ou muito encharcadas para análise, uma vez, que os nematoides não sobrevivem em solos e, ou, raízes nessas condições.

1.2. Objetivo

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

1.3. Realização da Aula Prática

1.3.1. Materiais e equipamentos

Enxada, enxada ou trado,
Saquinhos plásticos,
Luvas,
Um balde,
Etiquetas,
Caneta,
Ficha de
campo,
Prancheta,
Caixa térmica,
GPS - Sistema de Posicionamento Global.

1.3.2. Normas de segurança e 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.

A seguir, encontra-se o passo a passo para a **amostragem e coleta** de solo e/ou raízes para culturas anuais, perenes ou em viveiros de mudas. Siga corretamente as etapas para garantir que sua amostragem seja representativa e, sempre que necessário, utilize o bom senso para coletar um número adequado de subamostras.

Plano amostral deve responder as seguintes perguntas: o que coletar, quanto, onde, quando e como?

1.4 Procedimentos de Amostragem

A amostragem correta é essencial para a identificação da presença de nematoides e outros agentes fitopatogênicos. Para garantir uma análise representativa, a amostragem deve ser realizada seguindo critérios específicos para cada tipo de cultura:

- **Amostragem em reboleiras:** Reboleiras são manchas ou áreas irregulares em uma lavoura onde se observa o desenvolvimento desigual das plantas — geralmente com sintomas de crescimento reduzido, amarelecimento, murcha ou morte. Deve-se coletar amostras em pelo menos quatro pontos equidistantes dos bordos da reboleira, formando uma amostra composta. O solo e as raízes devem ser coletados em profundidades entre 2 e 20 cm. O deslocamento na área deve seguir um padrão em zigue-zague, priorizando plantas com sintomas moderados e evitando aquelas já gravemente afetadas. Quando houver manchas ou reboleiras bem definidas, a coleta deve ocorrer preferencialmente nas periferias, onde os organismos patogênicos estão mais ativos. Além disso, recomenda-se a realização de uma amostragem complementar em áreas adjacentes sem sintomas aparentes para comparação entre plantas afetadas e sadias (Decraemer, Hunt, 2006).
- **Amostragem em culturas perenes** (frutíferas, banana, café, etc.): Deve seguir os mesmos procedimentos das culturas anuais, com algumas adaptações. Em áreas sem sintomas, a coleta deve ser feita em plantas aleatórias ao longo do pomar, de forma intercalada. Devem ser coletados **200 a 500 g de solo e aproximadamente 20 a 40 g**

de raiz da cultura em três pontos distintos, sempre na projeção da copa. Em áreas com

sintomas, a coleta deve ocorrer na periferia da área afetada (Oliveira, Santos, Castro, 2016).

- **Amostragem em viveiros de mudas:** Devem ser escolhidas aleatoriamente **10 ou mais mudas para cada lote de mil plantas**, considerando aquelas da mesma espécie, variedade e tipo de solo. Caso haja mudas subdesenvolvidas, a amostragem deve ser realizada separadamente. Para mudas já crescidas, pode-se eliminar a parte aérea antes da coleta (Goulart et al., 2009; Pinheiro, 2017).

2. Procedimentos de Coleta

2.1 Preparação do local:

- Limpar o terreno no local de coleta num raio de 50 cm.
- Eliminar a camada superficial de **1 a 2 cm de solo**, pois esta pode conter nematoides mortos devido à incidência dos raios solares.

2.2 Coleta das amostras:

- Coletar as amostras de solo com **umidade natural (50 a 60 % da capacidade de campo)**, evitando que sequem antes da análise.
- Caminhar pela área em **zigue-zague** e abrir o solo em formato de "V", coletando amostras de **2 a 25 cm de profundidade**. O material deve ser colocado em um balde para posterior homogeneização.

2.3 Quantidade de subamostras por tipo de cultura:

- **Culturas anuais** (soja, algodão, milho, olerícolas, etc.): coletar no mínimo **10 subamostras por hectare**, sempre na zona das raízes, incluindo-as na amostra sempre que possível.
- **Culturas perenes** (café, figo, citros, etc.): coletar no mínimo **10 subamostras**, nos quadrantes **Norte, Sul, Leste e Oeste**, sempre na projeção da copa e incluindo raízes, se possível. Amostrare áreas com sintomas fortes, médios e sem sintomas para melhor análise.
- **Viveiros de mudas** (café, citros, seringueira, espécies florestais, etc.): coletar aleatoriamente **no mínimo 10 mudas por lote de 1.000 mudas**, tomando parte do solo e radículas de cada uma sem destruí-las. Radículas são raízes finas e jovens, responsáveis pela absorção de água e nutrientes. Por serem numerosas e delicadas, são os principais locais de penetração de nematoides fitoparasitas, como *Meloidogyne spp.*, podendo apresentar galhas, lesões e deformações. São fundamentais no diagnóstico e na coleta de amostras para análise nematológica.

3. Homogeneização das amostras:

- As subamostras coletadas no balde devem ser **bem misturadas**.
- Separar uma **amostra composta** de no mínimo **500 g de solo e 100 g de raízes secundárias**.
- Coletar uma amostra composta para cada hectare ou talhão homogêneo.

4. Armazenamento e envio:

- Embalar as amostras em **sacos plásticos bem fechados** para evitar perda de umidade.
- Identificar corretamente cada amostra com **local, data da coleta, proprietário, cultura e outras informações necessárias**.
- **Preencher uma ficha de campo** com um croqui das áreas amostradas.
- **Encaminhar as amostras ao laboratório o mais rápido possível**.
- **Evitar exposição ao sol ou calor**. Se necessário, armazenar temporariamente na **parte inferior da geladeira**, onde ficam frutas e hortaliças, ou em uma **caixa térmica**.

Obs.: as amostras de solo e raízes com nematoides podem ser armazenadas temporariamente na geladeira, preferencialmente na parte inferior (gaveta de frutas e hortaliças), por até 7 dias, desde que bem embaladas (em sacos plásticos fechados) para evitar perda de umidade. No entanto, o ideal é que o envio ao laboratório ocorra o mais rápido possível, dentro de 24 a 48 horas, para garantir a viabilidade dos nematoides vivos, especialmente dos juvenis (J2), que são sensíveis ao ressecamento ou excesso de umidade.

Esse procedimento garante que as amostras coletadas sejam representativas e adequadas para a análise de nematoides e outros fitopatógenos.

A seguir a Figura 1.1 representa a divisão de uma área em diferentes **glebas (G)**, classificadas conforme a profundidade do solo e a presença de lençol freático. As glebas estão organizadas em três categorias principais: **solo raso (1)**, **solo profundo (2)** e **lençol freático (3)**. No topo da área, encontram-se as glebas **G-1 e G-2**, diferenciadas pela aplicação ou não de calagem. A **G-3** corresponde a uma encosta, enquanto a **G-4** representa uma área isolada de solo raso. Em regiões mais baixas, a gleba **G-6** é utilizada para pastagem, enquanto as glebas **G-7 e G-8** estão próximas ao lençol freático, sendo caracterizadas como várzea.

Esse tipo de mapeamento é essencial para o planejamento agrícola, pois permite identificar as condições do solo e adotar estratégias adequadas de manejo para cada área.

Figura 1.1- Esquema de divisão de uma propriedade em glebas ou talhões a serem amostrados.



Fonte: Amostradores de solo "SONDATERRA" (2017)

Esquema de Classificação do Solo por Glebas

Legenda:

◆ **G = Gleba** (Área específica do terreno)

◆ Tipos de Solo:

- (1) Solo Raso
- (2) Solo Profundo
- (3) Lençol Freático

◆ Distribuição das Glebas:

1- Região de Solo Raso

- **G-1:** Com calagem
- **G-2:** Sem calagem
- **G-3:** Encosta
- **G-4:** Área isolada de solo raso

2- Região de Solo Profundo

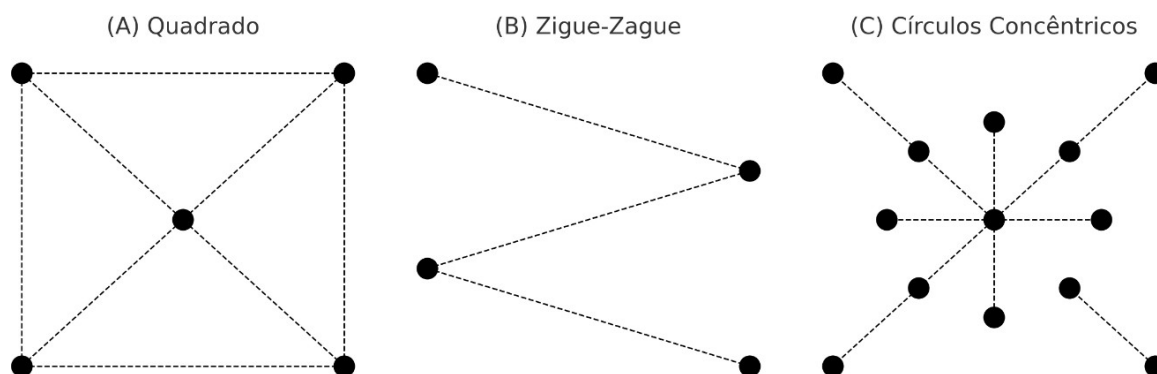
- **G-6:** Pastagem

3- Região do Lençol Freático

- **G-7:** Várzea
- **G-8:** Área de baixa altitude

A Figura 1.3 apresenta três diferentes esquemas de amostragem comumente utilizados: (A) amostragem em formato quadrado, onde cinco subamostras compõem uma amostra composta; (B) amostragem em zigue-zague, que permite maior abrangência da área analisada; e (C) amostragem em círculos concêntricos, recomendada para detecção de nematoides em pontos estratégicos da lavoura. A escolha do método mais adequado depende das condições do solo, da cultura e da finalidade da análise.

Figura 1.2 - Exemplos de esquemas de amostragem de solo para análise de nematoides.



Fonte: Adaptado de Goulart (2009)

Cada pequeno círculo preenchido com a coloração escura representa um ponto de coleta.

(A) Amostragem em formato quadrado com cinco subamostras.

(B) Amostragem em zigue-zague.

(C) Amostragem em círculos concêntricos com 12 subamostras.

Figura 1.3 - Procedimento de coleta de amostra de solo para análise nematológica.



A. Área de coleta e ferramentas utilizadas. Imagem mostra o local da coleta de solo em área cultivada, limpe a área com o inchadão e em seguida com o uso de trado ou sonda para amostragem em profundidade. **B. Amostra individual de solo.** Solo coletado em um ponto específico, com o trado cilíndrico. Esse tipo de coleta deve ser feita em diferentes locais da área para formar uma amostra composta. **C. Coleta manual com pá em área agrícola.** Coleta feita em reboleira ou ponto sintomático, com uso de pá para retirada de solo próximo às raízes de plantas com sintomas. **D. Formação da amostra composta.** As amostras de solo de diferentes pontos são reunidas em um saco plástico para homogeneização, formando uma amostra representativa da área. **E. Acondicionamento da amostra.** O solo homogeneizado é acondicionado em saco plástico transparente, devidamente fechado e identificado para envio ao laboratório. **F. Transporte da amostra para o laboratório.**

Amostras armazenadas em caixa térmica, protegidas contra calor e desidratação, para garantir a integridade dos nematoides até a análise laboratorial

Fonte: Silva, (2019)

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 soil biology: sampling and characterization of below-ground biodiversity**. London: Earthscan, 2008. p. 97-106.

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

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

DECRAEMER, W.; HUNT, D. J. Structure and classification. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Ed.). **Plant Nematology**. Wallingford, Oxfordshire, Reino Unido: CAB International, 2006. p. 3-32.

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

GOULART, A. M. C. *et al.* **Coleta de amostras para análise de nematoides: recomendações gerais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009.

MACHADO, O. C. Z.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. C. B. **Métodos em nematologia agrícola**. Corteva Agriscience, 2019.

NOVARETTI, W. R. T. **Coleta de amostras de raízes e solo para análise nematológica**. Campinas-SP, 2011. 31 p.

OLIVEIRA, C. M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO, L. H. S. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas, SP: Millennium, 2016.

PINHEIRO, J. B. **Nematoides em hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

SONDATERRA. Manual de instruções. Piracicaba – São Paulo, 2017.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola**. In: _____. **Métodos de coleta de amostras de solo e raízes para análises**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV, 1989. cap. 1, p. 28-33.

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 e 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 e a movimentação dos nematoides, quando vivos estes se movem 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 execução.

Desvantagens: É um procedimento cujo o resultado é relativamente demorado (24 a 48 h), os nematoides devem estar vivos, nematoides de pouca mobilidade e com cutícula anelada não passa pelo filtro e possui baixa eficiência.

2.2 Objetivo

Proporcionar aos discentes o passo a passo da extração de nematoides de solo aplicando o método do Funil de Baermann, 1917.

2.3. Realização da Aula Prática

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;

Suporte de malha de aço ou de madeira;

Filtro de papel;

Água (preferencialmente destilada);

Lupa;

Copo americano;

Placa de Petri ou siracuse;

Microscópio estereoscópio (lupa)

Microscópio de Luz.

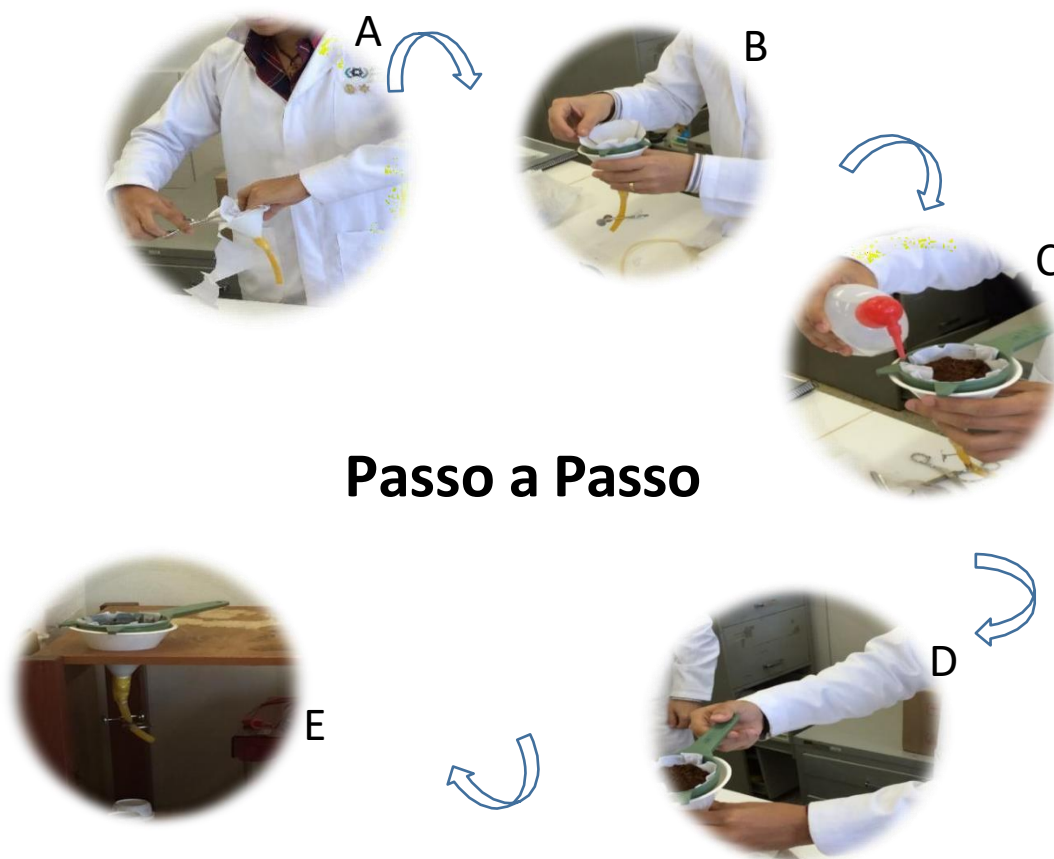
2.3.2. Normas de segurança para a aula, sugestões para consolidação da prática

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 *presilha de metal*, 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 do 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 passem pelo filtro. Deixe o funil em repouso de 24 a 48 horas.
- 5º) Após este período, 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- Técnica do Funil de *Baermann*, 1917, utilizada para a extração de nematoides do solo.



Referências sugeridas:

BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von Ankylostomum (nematoden) larven in erdproben. **Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië**, v. 57, p. 131-137, 1917.

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

INSTITUTO FEDERAL GOIANO. **Método de decantação, peneiramento e funil de Baermann – High quality and size**. Direção de Milton Lima. Urutaí-GO, 2011. Color. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=ClOoxU75BcE>. Acesso em: 10 jan. 2025.

MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A. **Métodos em Nematologia Agrícola**, 2019.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola**. In: **Métodos de coleta de amostras de solo e raízes para análises**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV, 1989. cap. 1, p. 28-33.

Aula prática 3: Extração de Nematoides do Solo – Método da Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose (Jenkins, 1964).

3.1 Introdução

O método de extração de nematoides por centrifugação é atualmente, o mais utilizado na rotina dos laboratórios de nematologia em todo o Brasil. Pode ser utilizado para extração de nematoides de solo e raízes, sendo eficaz para os nematoides grandes e de pouca mobilidade como o *Xiphinema* e os Criconematidoidea. A força G é o princípio utilizado neste método. Na centrifugação, a velocidade é um fator essencial para a separação. Em geral, quanto maior a rotação, melhor a eficiência do processo. Com o uso de soluções densas como solução de sacarose a 45% 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.

3.2 Objetivo

Proporcionar aos discentes conhecer e desenvolver 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).

3.3 Realização da Aula Prática

3.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas;
Balde ou bacia de 2 a 5 L;
Água (preferencialmente destilada);
Açúcar cristal;
Peneira de malha de 400 *mesh* com abertura de 0,037 mm;
Peneira de malha de 20 *mesh* com abertura de 0,841 mm;
Pisseta;
Pipetador;
Bastão de vidro;
Béquero 100 ml;
Tubos de ensaio 80 ml,
Cronômetro;
Balança;
Centrífuga;
Microscópio de Luz.

Informação importante!!!

O termo "**Mesh**" refere-se à numeração das peneiras granulométricas, que são classificadas conforme o tamanho de suas aberturas. Essas peneiras são amplamente utilizadas na maioria dos métodos de extração, tanto para raízes e outras partes vegetais quanto para solo ou substrato, desempenhando um papel fundamental na separação de partículas conforme sua granulometria (Machado, Silva, 2019).

Tabela 3.1 – Quadro de correlação entre mesh, abertura e normas de peneiras

Mesh (ABNT/NBR)	Mesh (Tyler)	Mesh (ASTM)	Abertura (mm)	Abertura (µm)
3	3	6	6,68	6680
4	4	8	4,76	4760
6	6	12	3,36	3360
8	8	16	2,38	2380
10	10	20	1,68	1680
12	12	24	1,41	1410
16	16	30	1,19	1190
20	20	40	0,841	841
30	28	60	0,595	595
40	35	80	0,420	420
50	48	100	0,297	297
100	100	150	0,149	149
200	200	200	0,074	74
325	325	325	0,044	44

Fonte: Lima *et. al.* (2020)

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.

3.3.4 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. Importante pesar os tubos com a suspensão, para ter a mesma massa e colocá-los um de frente ao outro.

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.

3.4. Procedimentos

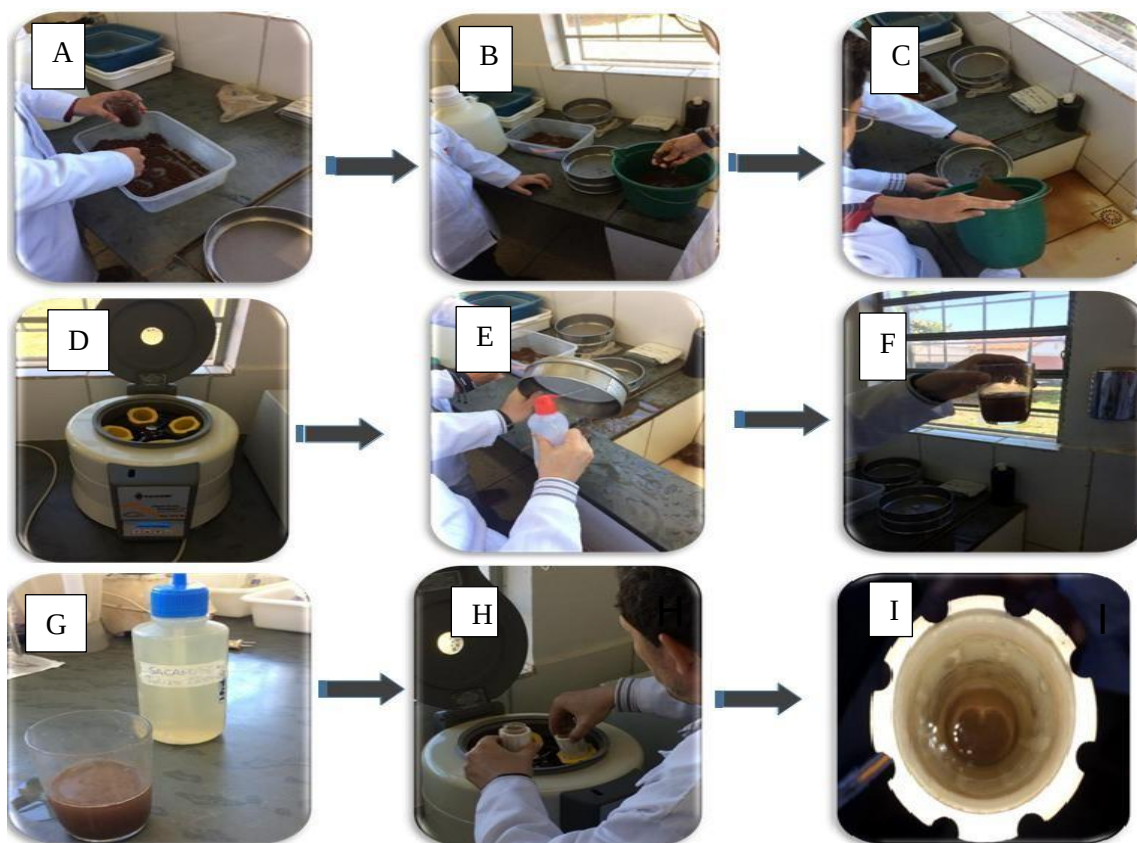
1º) Homogenizar a amostra de solo ou substrato.

2º) Coloque o líquido do béquer nos tubos de centrifuga de 80 mL, tendo o cuidado para que fiquem balanceados. Centrifugue por 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 etapa).

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 fotônico.

Figura 3.1 - Flotação em Centrífuga com Solução de Sacarose descrito por Jenkins (1964).



Fonte: Silva, Rodrigo (2020)

3.5 Vantagens e Desvantagens

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.

Referências sugeridas:

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

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola**. In: _____. **Métodos de coleta de amostras de solo e raízes para análises**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV, 1989. cap. 1, p. 28-33.

LIMA, H. B. S. *et. al.* **Estudo da influência da sedimentação gravitacional da lama vermelha na resistência a chamas de Compósitos Poliméricos**. In: **Processos Químicos e Biotecnológicos – Volume 4**: Editora Poisson – Belo Horizonte - MG: Poisson, 2020

Aula prática 4: Extração de Nematoides de Raízes - Método do Liquidificador e Centrifugação com Solução de Sacarose e Caulim (Coolen, D'Herde, 1972).

4.1 Introdução

O método de extração de nematoides de raízes utilizando o liquidificador, centrifugação com solução de sacarose e caulim é ideal para extração de ovos e larvas de raízes com galhas infectadas por *Meloidogyne* spp. Além disso, pode ser usado para extrair formas jovens e adultos de alguns nematoides endoparasitas a exemplo os gêneros *Pratylenchus* e *Radopholus*,

4.2 Objetivo

Proporcionar aos discentes o passo a passo da extração de ovos e juvenis de nematoides endoparasitas presentes em raízes

4.3 Realização da Aula Prática

4.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,
Balde,
Tesoura,
Liquidificador doméstico,
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,
Caulim (tipo de argila branca, fina e macia, composta principalmente por caulinita),
Pipetador,
Água (preferencialmente destilada),
Sacarose,
Bastão de
vidro, Pisseta,
Balança,
Cronômetro,
Lupa,
Microscópio de luz.

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

Os alunos devem durante o desenvolvimento da parte laboratorial, usar luvas e jaleco.

4.3.3 Atenção!

Observe se a centrífuga está com os pés alinhados na bancada, 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.

4.4 Procedimentos

1º) Coletar as raízes infectadas, 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 NaClOCL (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.

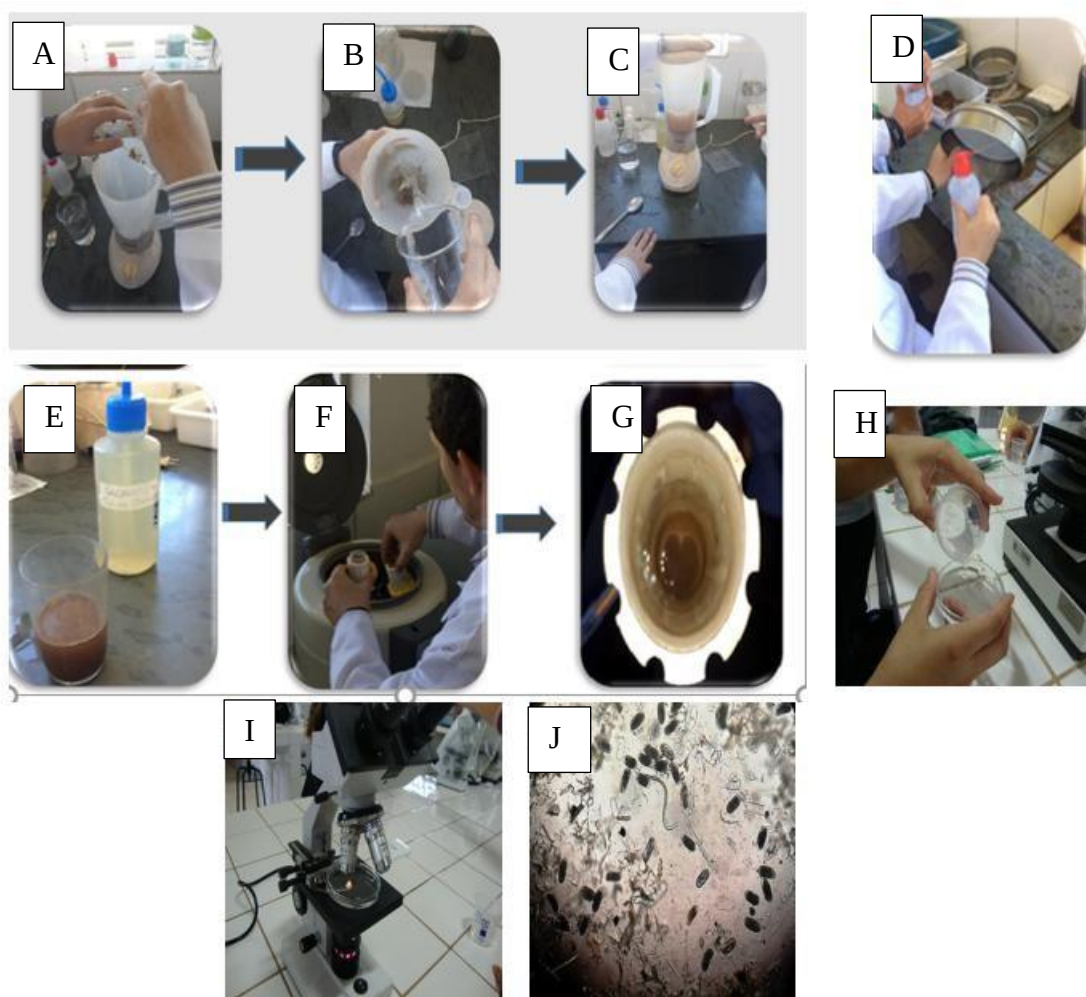
4º) Transfira a suspensão mais os restos vegetais para os tubos de centrífuga, tomando o cuidado de equilibrá-los.

5º) Adicione nos tubos 1 mL de Caulim, misture bem com um bastão de vidro e coloque na centrífuga. Centrifugue por 4-5 minutos a 1750 rpm. O caulim é utilizado nesse procedimento como um carreador inerte durante a centrifugação inicial, auxiliando na formação de um pellet (resíduo sedimentado no fundo do tubo) mais definido. Ele melhora a separação entre os resíduos vegetais e os nematoides, facilitando a decantação sem interferir quimicamente nos organismos.

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 na lupa ou microscópio, a seguir realize a identificação e contagem em microscópio de Luz no aumento de 100 X.

Figura 4.1 - Método de extração de nematoides de tecidos vegetais por trituração seguida de flotação e centrifugação (Coolen & D' Herde, 1972).



Fonte: Silva, (2020).

4.5 Vantagens e desvantagens

O método de Coolen e D'Harde é amplamente utilizado na extração de fitonematoides de raízes devido à sua eficiência e rapidez. Comparável ao método de Jenkins, essa metodologia permite a extração de um grande número de espécimes e ovos de *Meloidogyne* spp., abrangendo diferentes estágios do ciclo de vida dos nematoides. Além disso, adaptações como a adição de caulim melhoram a eficiência da extração, tornando-o um método confiável para análises (Souza Jr. *et al.*, 2020).

Entretanto, o método apresenta algumas desvantagens. A necessidade de equipamentos específicos, como centrífugas e peneiras adequadas, pode aumentar os custos do procedimento. Além disso, cada espécie de nematoides pode exigir tempos de centrifugação distintos, o que demanda ajustes para otimizar a extração. Outro ponto a ser considerado é que o uso de liquidificador na trituração das raízes pode comprometer a integridade de estruturas mais frágeis, se o processo não for bem controlado (Souza Jr. *et al.*, 2020).

Referências sugeridas:

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

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

SOUZA JR. *et al.* Eficiência de diferentes métodos de extração de *Meloidogyne* spp. na cultura da aceroleira. **Científic@ Multidisciplinary Journal**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1-8, 2020.

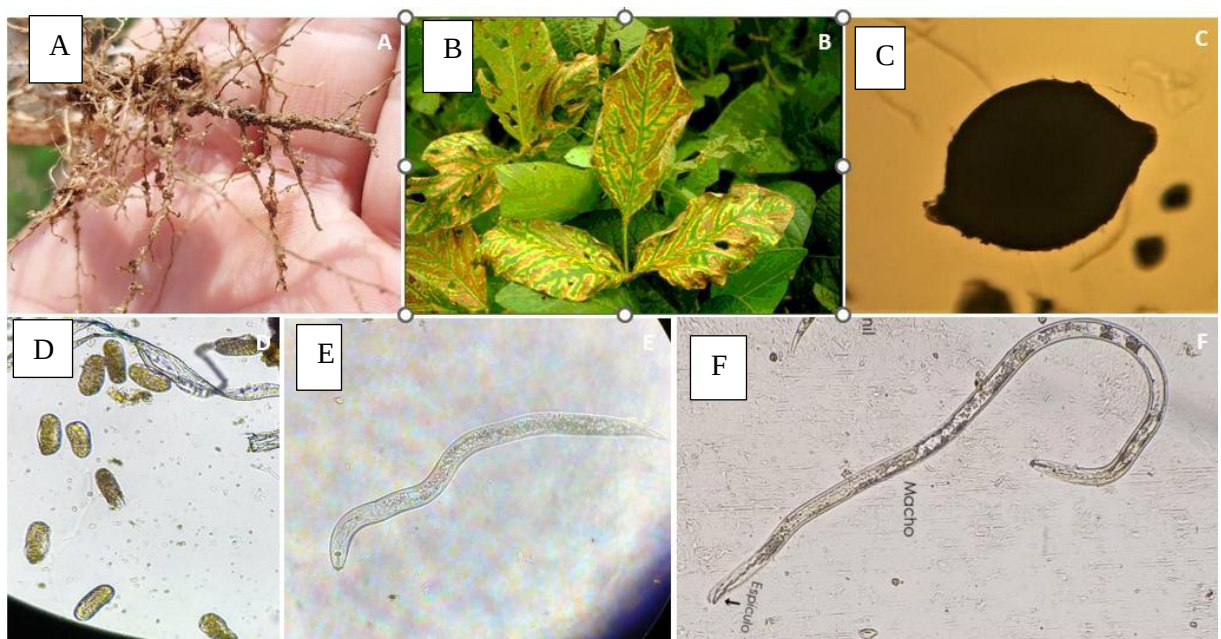
TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola**. In: _____. **Métodos de coleta de amostras de solo e raízes para análises**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV, 1989. cap. 1, p. 28-33.

Aula prática 5: Método para Extração de Cistos de *Heterodera glycines* a partir de Solo úmido utilizando solução de sacarose densa (Dunn, 1969).

5.1. Introdução

O nematoide de cisto da soja (NCS) *Heterodera glycines* é um dos principais nematoides que limita a produção de soja no Brasil e no mundo. Esses nematoides formam cistos nas raízes, além de prejudicar a absorção de nutrientes e água, o que leva a sintomas como amarelecimento foliar, nanismo e queda no número de vagens. Sua disseminação ocorre via solo, máquinas ou água, e sua resistência a condições adversas dificulta o controle. O manejo integrado, incluindo rotação de culturas, uso de variedades resistentes e monitoramento do solo, é essencial para reduzir infestações. A ocorrência silenciosa deste patógeno, muitas vezes identificada tardiamente, torna seu impacto econômico ainda mais crítico para a agricultura sustentável. O presente método é aplicado quando se deseja extrair cistos de nematoides da espécie *Heterodera glycines* a partir de solo úmido, seguindo a metodologia de Dunn (1969).

Figura 5.1 Nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*.



A: Sintoma e sinais nas raízes de soja. **B:** sintoma de carijó, amarelecimento foliar em soja sob ataque do nematoide. **C:** Cisto de *H. glycines*. **D:** Ovos de *H. glycines*. **E:** Juvenil de segundo estágio. **F:** Macho de *H. glycines*.

Fonte: Silva, (2020); Silveira, (2020).

5.2. Objetivo

Realizar a extração de cistos de *Heterodera glycines* a partir de solo úmido infestado, seguindo a metodologia de Dunn (1969).

5.3. Realização da Aula Prática

5.3.1. Materiais e equipamentos

Centrífuga de bancada;
Microscópio fotônico;
Amostras de solo úmidas;
Balde 2 L;
Água;
Peneira de 100 mesh com abertura de 0,150 mm;
Açúcar;
Pisseta;
Tubo de centrífuga;
Béquers;
Placas de fundo quadriculado.

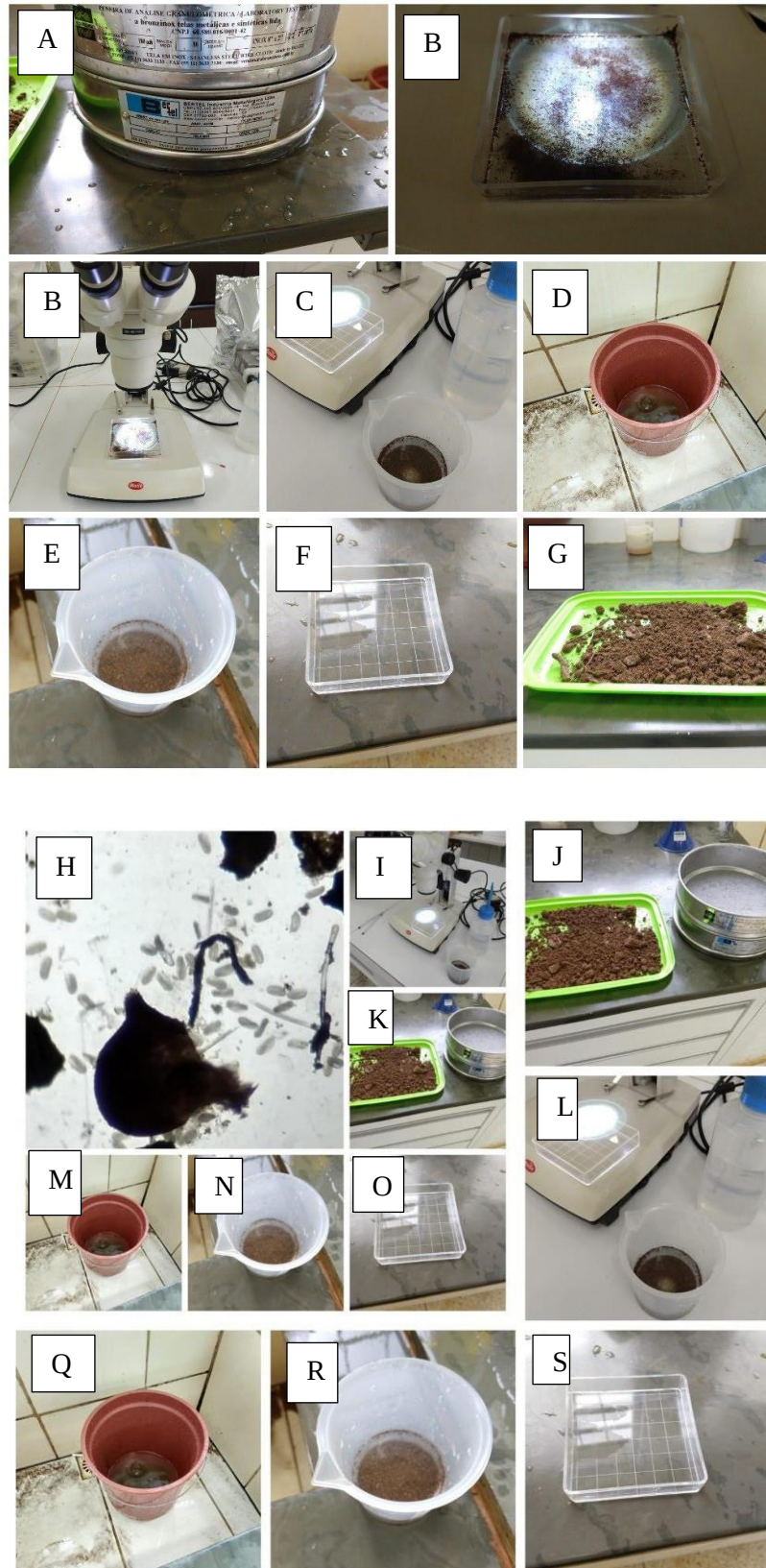
5.3.2. Normas de segurança

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

5.4 Procedimentos

- 1º) Coloque a amostra de solo (cerca de 100 ml) em um balde de 2L e adicione água de torneira e a seguir realize o destorroamento do solo com as mãos.
- 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 (força centrífuga relativa) ou aproximadamente 1.800 rpm, dependendo do raio do rotor da centrífuga.
- 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 análise sob microscópio estereoscópio. Outra opção seria filtrar em um funil de *Buchner* forrado com papel-filtro. Em seguida, transporte o papel-filtro para o microscópio estereoscópio e, sob a luz incidente, efetue a leitura.

Figura 5.2 - Extração de cisto *Heterodera glycines*



A. Peneiramento da amostra de solo seco: Uso de peneiras com diferentes malhas para separar o material orgânico e solo fino, onde os cistos podem estar presentes. **B. Triagem sob luz direta:** A amostra peneirada é colocada em bandeja de Petri e examinada sob luz direta para localizar visualmente os cistos. **C. Observação ao no microscópio estereoscópio:** Verificação da presença de cistos e sua identificação com aumento adequado. **D. Preparação da amostra com iluminação inferior:** O material é disposto em bandeja quadriculada com iluminação inferior para facilitar a visualização. **E. Lavagem em recipiente cônico:** A amostra é lavada com água para separar os cistos por decantação. **F. Decantação:** Após repouso, os cistos se depositam no fundo do recipiente, facilitando a concentração do material desejado. **G. Uso de bandeja quadriculada:** A amostra

decantada é transferida para uma bandeja transparente com grade para contagem sistemática dos cistos ao microscópio. **H. Solo seco preparado:** Etapa inicial ou final do processo, mostrando o solo após triagem, pronto para armazenamento ou análise posterior. **I. Visualização de cistos e ovos ao microscópio:** Imagem ampliada mostrando cistos e juvenis de *Heterodera* liberados. **J. Montagem do sistema de triagem:** Organização do ambiente com microscópio estereoscópico e bandejas de iluminação para triagem dos cistos. **K. Aplicação de luz inferior:** A amostra sobre bandeja quadriculada é iluminada por baixo, facilitando a detecção dos cistos. **L. Etapa de decantação em recipiente cônico:** A amostra passa por lavagem para separação dos cistos por densidade. **M. Transferência da solução com cistos para decantação:** Após lavagem, o líquido contendo os cistos é deixado em repouso. **N. Uso de bandeja quadriculada para triagem:** Auxilia na contagem e separação precisa dos cistos durante observação ao microscópio. **O. Triagem e peneiramento inicial da amostra seca:** Peneiras são usadas para separar partículas grandes e facilitar a recuperação de cistos. **P. Observação da amostra sob luz:** Verificação da amostra com luz inferior antes da coleta dos cistos. **Q. Nova etapa de decantação:** Repetição do processo de sedimentação para maior pureza na amostra. **R. Amostra decantada pronta para análise:** Após repouso, o sobrenadante é descartado e o sedimento contém os cistos. **S. Bandeja quadriculada para contagem final:** Etapa final antes da identificação e quantificação sob microscópio.

Fonte: Silva, (2018)

5.5 Vantagens e desvantagens

O método de Dunn (1969) apresenta diversas vantagens na extração de cistos do solo e de fêmeas de *Heterodera glycines* das raízes de soja. A flotação centrífuga com solução densa de sacarose permite uma separação eficiente, minimizando perdas e preservando a integridade dos cistos e fêmeas para análise posterior. Além disso, a técnica pode ser aplicada tanto na extração de cistos do solo quanto na remoção de fêmeas das raízes, tornando-a versátil para estudos nematológicos. Outro benefício é a remoção de impurezas, como matéria orgânica e resíduos do solo, resultando em amostras mais puras e facilitando a contagem de ovos e fêmeas sob o microscópio (Mizobuti, 2001).

Desvantagens: o processo é relativamente demorado e exige cuidado para evitar perdas de amostras, já que erros na concentração da solução de sacarose ou na centrifugação podem comprometer a eficiência da separação. Outro ponto a ser considerado é a necessidade de treinamento adequado para que os operadores realizem a técnica corretamente, garantindo a precisão dos resultados (Mizobuti, 2001).

Referências sugeridas:

DUNN, R. A. Extraction of cysts of *Heterodera glycines* from soils by centrifugation in high-density solutions. **Journal of Nematology**, v. 1, p. 7, 1969.

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

MIZOBUTI, E. H. **Caracterização da resistência da linhagem L2300 de feijoeiro a *Heterodera glycines***. 2001. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001. Orientador: Silamar Ferraz. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, Everaldo Gonçalves de Barros e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Aula prática 6: Extração de Nematoides de Partes Aéreas de Plantas

6.1. Introdução

Os nematoides do gênero *Aphelenchoides* são conhecidos por sua atuação como fitoparasitas, especialmente na parte aérea das plantas. Além disso, possuem hábito micófago, alimentando-se de fungos presentes no solo, o que contribui para sua sobrevivência em diferentes condições ambientais. A presença desses nematoides pode causar diversos sintomas nas plantas hospedeiras, como amarelecimento e murcha das folhas, clorose, redução na produção, desuniformidade no porte das plantas e no tamanho de folhas e frutos. Espécies desse grupo têm sido associadas a danos significativos em culturas como arroz, plantas ornamentais e florestais. Sua capacidade de agir como ectoparasitas migradores permite que se desloquem facilmente entre os tecidos infectados e novas áreas de infecção. Diante da importância fitopatológica dessas espécies, o método a seguir descreve detalhadamente o processo de extração desses nematoides para fins de diagnóstico e estudo (Zamboni, 2019).

O gênero *Ditylenchus*, descrito por Thorne em 1945 nos Estados Unidos, compreende nematoides de significativa importância econômica, conhecidos por parasitarem diversas culturas agrícolas, como batata, beterraba e cenoura. Recentemente, uma nova espécie desse gênero foi identificada no município de Morrinhos, no estado de Goiás, ampliando o conhecimento sobre sua distribuição geográfica no Brasil. O ciclo biológico desses nematoides ocorre em uma faixa de temperatura entre 5 °C e 34 °C, sendo o tempo de desenvolvimento diretamente influenciado pela temperatura ambiente. A disseminação acontece principalmente por meio de material vegetal infectado, além de partículas de solo que podem ser transportadas pelo vento, pela água ou por ferramentas agrícolas contaminadas. Diferentemente de *Ditylenchus dipsaci*, essa espécie não forma aglomerações nem apresenta estágio de resistência, embora consiga sobreviver como ovo durante o inverno (Gonzaga; Oliveira, 2018).

Esse nematoide infecta partes subterrâneas das plantas, causando lesões necróticas e desintegração dos tecidos, podendo levar à podridão e mumificação dos tubérculos, especialmente durante o armazenamento. A infestação se inicia pelas lenticelas, levando ao escurecimento e enrugamento da casca. Os danos são agravados por infecções secundárias de fungos e bactérias. Em outras culturas, como tulipas e íris, a infecção começa na base do bulbo, resultando em lesões amareladas ou marrom-escuras (Gonzaga, Oliveira, 2018).

6.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é conhecer e realizar a metodologia de extração de nematoides de partes aéreas de plantas.

6.3. Realização da Aula Prática

6.3.1. Materiais e equipamentos

Pedaços de bulbo, estipe ou folhas da cultura,
Água (preferencialmente destilada),
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.

6.3.2. Normas de segurança

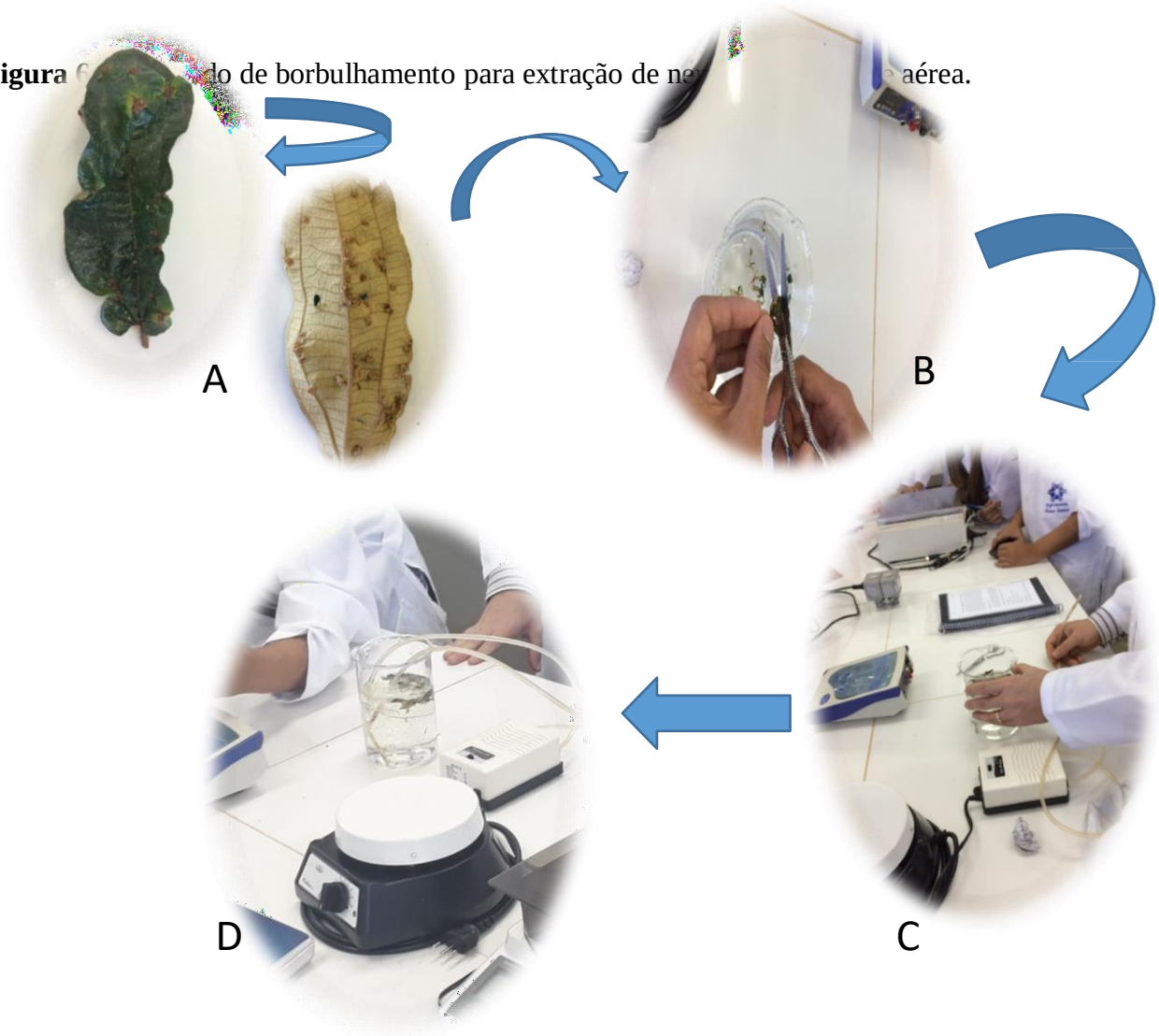
Durante o desenvolvimento da aula prática, os alunos deverão usar luvas e jaleco.

6.4 Procedimentos

- 1º) Lave os pedaços de bulbo, estipe ou folhas e pique-os com a tesoura em pedaços de 1 a 2 cm.
- 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 *becker*.

A Figura 6.1 apresenta um sistema utilizado no método de borbulhamento para a extração de nematoides da parte aérea das plantas. Esse método consiste no uso de um compressor de ar, que gera borbulhas em uma suspensão contendo material vegetal e água, facilitando a liberação dos nematoides presentes. O equipamento visto na imagem inclui um compressor conectado a um béquer com uma solução turva, onde o processo de aeração auxilia na separação dos organismos do substrato. Essa técnica é amplamente utilizada em laboratórios de nematologia, pois permite a extração eficiente dos nematoides sem causar danos significativos à sua estrutura.

Figura 6 Método de borbulhamento para extração de nematoides da parte aérea.



A. Seleção das folhas infectadas: Folhas com sintomas visíveis de infecção por nematoides (como galhas, necroses ou deformações) são coletadas para o processo de extração. **B. Raspagem ou corte das folhas em pedaços pequenos:** As folhas são cortadas ou raspadas com tesoura ou bisturi para facilitar a liberação dos nematoides presentes no tecido vegetal. **C. Imersão em água com aeração (borbulhamento):** Os fragmentos foliares são colocados em um copo com água, conectado a um sistema de aeração (compressor ou bomba de aquário), que produz bolhas continuamente. Isso facilita a liberação dos nematoides do tecido para a água. **D. Manutenção do sistema em repouso sob aeração:** O recipiente com folhas permanece sob borbulhamento por 24 a 48 horas, tempo suficiente para permitir que os nematoides migrem para a solução.

Fonte: Silva, (2022)

Atenção!

Ao realizar a extração de nematoides da parte aérea das plantas é fundamental garantir que o processo de aeração forçada com a bomba de aquário seja conduzido corretamente. O tempo de imersão do material vegetal na água (24 a 48 horas) deve ser rigorosamente monitorado, pois períodos inadequados podem comprometer a eficiência da extração, resultando em menor recuperação de espécimes.

Referências sugeridas:

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

GONZAGA, V. G.; OLIVEIRA, C. M. G. *Ditylenchus destructor* Thorne (Tylenchida: **nguinae**). In: Priorização de Pragas quarentenárias ausentes no Brasil, p. 277-291, 2018.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola**. In: _____. **Métodos de coleta de amostras de solo e raízes para análises**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV, 1989. cap. 1, p. 28-33.

ZAMBONI, A. C. **Métodos em nematologia agrícola**. Machado, A. C. Z.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. C. B. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2019. 184 p.

Aula prática 7: Coloração de Nematoides em Tecidos de Plantas - Método da Fucsina Ácida (Byrd *et al.*, 1983)

7.1 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 à coloração dos nematoides, facilitando desta maneira a quantificação deles 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.

7.2. Objetivo

O objetivo da presente aula prática é realizar com os estudantes a coloração de fitonematoides dentro das raízes por meio do método da fucsina ácida,

7.3. Realização da Aula Prática

7.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,

Água (preferencialmente destilada),

Tesoura,

Béquer 100 mL,

Bastão de vidro,

Peneira de nylon pequena,

Chapa aquecedora,

Hipoclorito de sódio NaOCl (geralmente usa-se uma solução comercial a 2% a 4% para o branqueamento das raízes. O hipoclorito deve ser diluído para aproximadamente 2,5% se a solução comercial for mais concentrada (normalmente 10-12%),

Glicerina,

Ácido clorídrico (normalmente utiliza-se uma solução diluída a cerca de 1% a 2% (v/v) para o processo de acidificação, que ajuda a fixar a coloração e remover resíduos),

Lâmina,

Lamínula,

Microscópio fotônico.

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

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

7.3.3 Atenção!

Na realização deste método deve-se ter cuidado na manipulação do ácido clorídrico e no aquecimento das soluções na chapa quente. Para a realização deste método, faz-se necessário à preparação de uma solução corante composta de:

75 mL de água destilada;

25 mL de ácido acético

PA;

350 mg fucsina ácida (0,35 g).

7.4 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 raízes em uma solução de hipoclorito de sódio por 4 a 6 minutos (50 mL de água) para clarear as raízes;

- 10 mL de NaOCI a 5,25% para raízes jovens;
- 20 mL de NaOCI a 5,25% para raízes de idade moderada;
- 30 mL de NaOCI a 5,25% para raízes velhas ou lignificadas.

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).

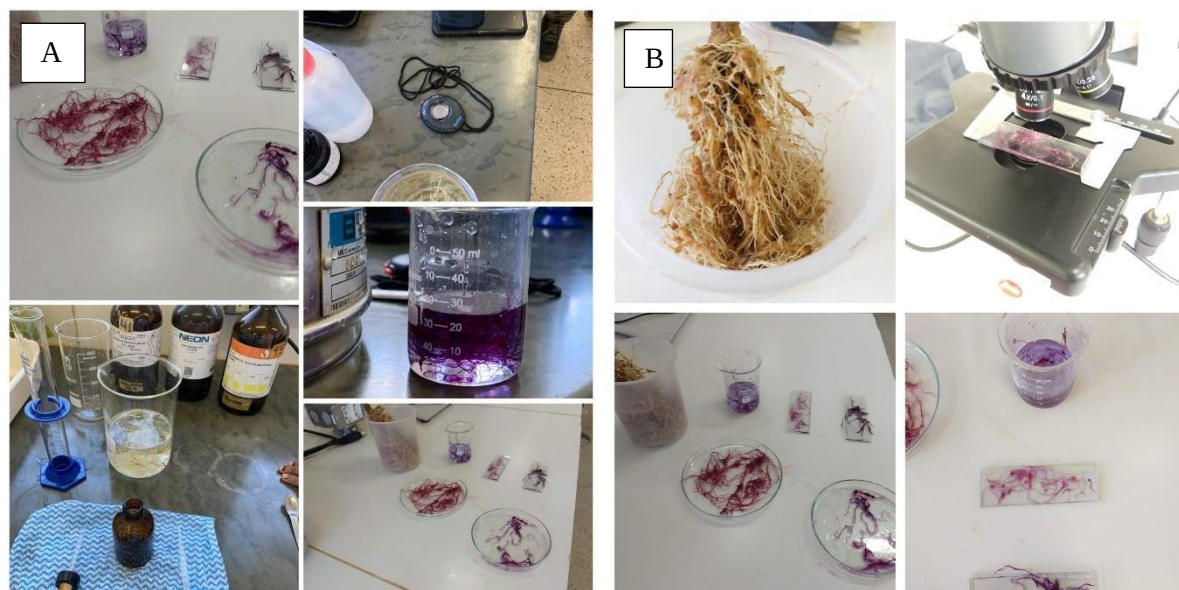
6º) Coloque as raízes em um béquer com água durante 15 minutos.

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 (HC1). Aqueça as raízes novamente e deixe esfriar.

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

Figura 7.1 – Coloração de raízes.

A - As imagens mostram o processo de coloração de raízes para a observação de nematoides endoparasitas, utilizando corantes como fucsina ácida para evidenciar a presença desses organismos nos tecidos vegetais. O procedimento inclui a coleta, lavagem e imersão das raízes em solução corante, seguidas pela montagem das amostras em placas de Petri e lâminas de microscopia para análise detalhada. B - O uso de um microscópio óptico permite visualizar nematoides como *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. no interior das raízes, facilitando o diagnóstico de infestações. Além disso, são visíveis no ambiente laboratorial vidrarias e reagentes químicos essenciais para a realização da técnica, comum em estudos de fitopatologia e nematologia vegetal.

Fonte: Silva, (2023)

Atenção!!

Na coloração de nematoides com Fucsina Ácida (Byrd *et al.*, 1983) é necessário que as raízes estejam em temperatura ambiente e que estejam secas. Também pode ter variação no tempo de coloração das raízes em função da espécie de planta. Para só então serem cobertas com glicerina e HCl 5N e em seguida serem cortadas e as lâminas montadas. As vantagens de fazer a coloração são: facilita a visualização dos nematoides; melhora a identificação morfológica; facilita a quantificação; auxilia no diagnóstico de campo e laboratório e é um recurso didático eficiente.

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**, Urutaí/GO, 2015, p. 100 -105.

BYRD, Jr., D. W.; KIRKPATRICK, J.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 142- 143, 1983.

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

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola**. In: _____. **Métodos de coleta de amostras de solo e raízes para análises**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV, 1989. cap. 1, p. 28-33.

Aula prática 8: Coloração de Massas de Ovos (Ootecas) de *Meloidogyne* spp. - Método da Fucsina Ácida (Silva *et al.*, 1988)

8.1. 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.

8.2. Objetivo

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

8.3. Realização da Aula Prática

8.3.1. Materiais e equipamentos

Luvas,
Água destilada,
Béquer 500 mL,
Fucsina ácida,
Água destilada,
Ácido acético glacial (em torno de 25% v/v).

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

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

8.3.3 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.

Figura 8.1 - Sintomatologia Radicular de Plantas Hospedeiras Infectadas por Nematoides das Galhas (*Meloidogyne* spp.)

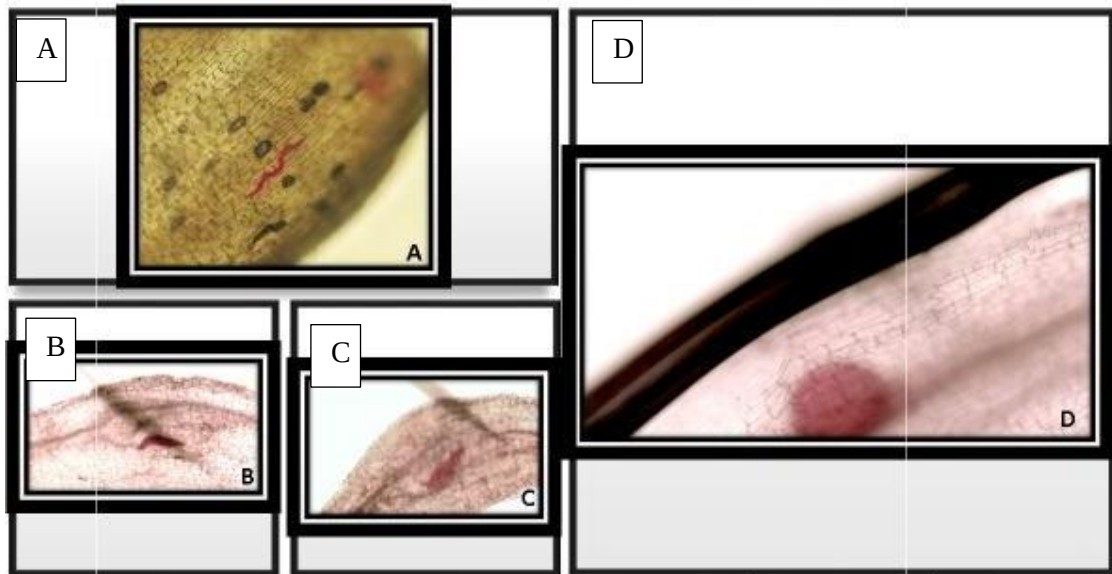
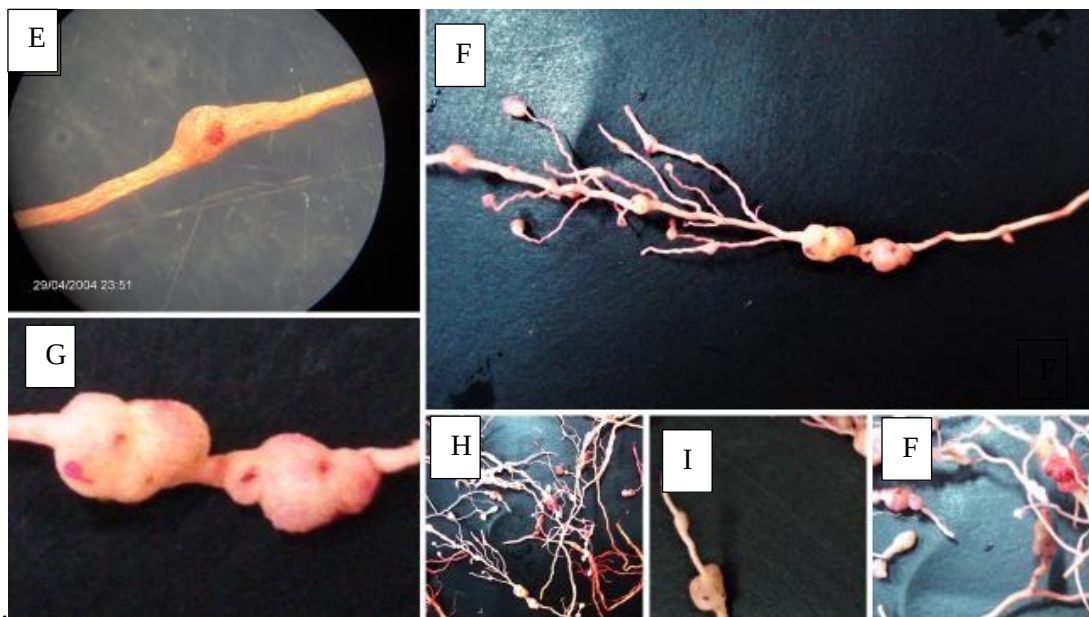


Figura 1. Nematode de galhas do cafeeiro *Meloidogyne exigua* coloridos pelo método de Byrd et al. (1983): A – Juvenil de segundo estágio (J2); B - Juvenil de terceiro estágio (J3); C - Juvenil de quarto estágio (J4) e D – fêmea adulta.



- A** – Juvenil de segundo estágio (J2): forma infectante, geralmente encontrada no solo e que penetra na raiz do hospedeiro. Corado de forma visível dentro do tecido radicular.
- B** – Juvenil de terceiro estágio (J3): já em desenvolvimento dentro da raiz, aumentando de tamanho.
- C** – Juvenil de quarto estágio (J4): próximo à fase adulta, visível como estrutura engrossada no interior da raiz.
- D** – Fêmea adulta: forma sedentária e esférica, estabelecida no interior do tecido radicular, com coloração intensa e corpo maior.
- E – F** - As imagens mostram **raízes de plantas com galhas** induzidas por nematoides do gênero *Meloidogyne*.
- G** - As galhas são **inchaços característicos** formados em resposta à infecção e ao desenvolvimento dos nematoides dentro das raízes.
- H** - Algumas imagens revelam, inclusive, **estruturas internas coradas** dos nematoides, indicando a presença de fêmeas adultas nas regiões hipertrofiadas.
- I – J** - A variação no número e tamanho das galhas reflete o **grau de infestação** e o tempo de infecção.
- Fonte:** Silva, (2019)

Atenção!!!

A avaliação da penetração e infecção de nematoides em sistemas radiculares exige atenção à metodologia utilizada. A coloração das massas de ovos, a contagem sob microscópio estereoscópico e a classificação das raízes seguem escalas específicas para o Índice de Massa de Ovos (IMO) e o Índice de Galhas (IG), conforme metodologias estabelecidas. O processamento das raízes envolve lavagem, secagem e pesagem antes da análise, seguindo protocolos padronizados. Além disso, fatores ambientais podem influenciar a secagem, exigindo controle rigoroso para garantir precisão e reprodutibilidade dos resultados.

Referências sugeridas:

CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XII, 1988, Dourados, MS. **Resumos.** Dourados, MS, 1988. p. 7.

MACHADO, A.; FERRAZ, L; SILVA, S. **Métodos em Nem. Agrícola.** Brazilian Nematological Society. ISBN: 978-65-80897-00-1, 2019.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola.** In: _____. **Métodos de coleta de amostras de solo e raízes para análises.** 1. ed. Jaboticabal: FCAV, 1989. cap. 1, p. 28-33.

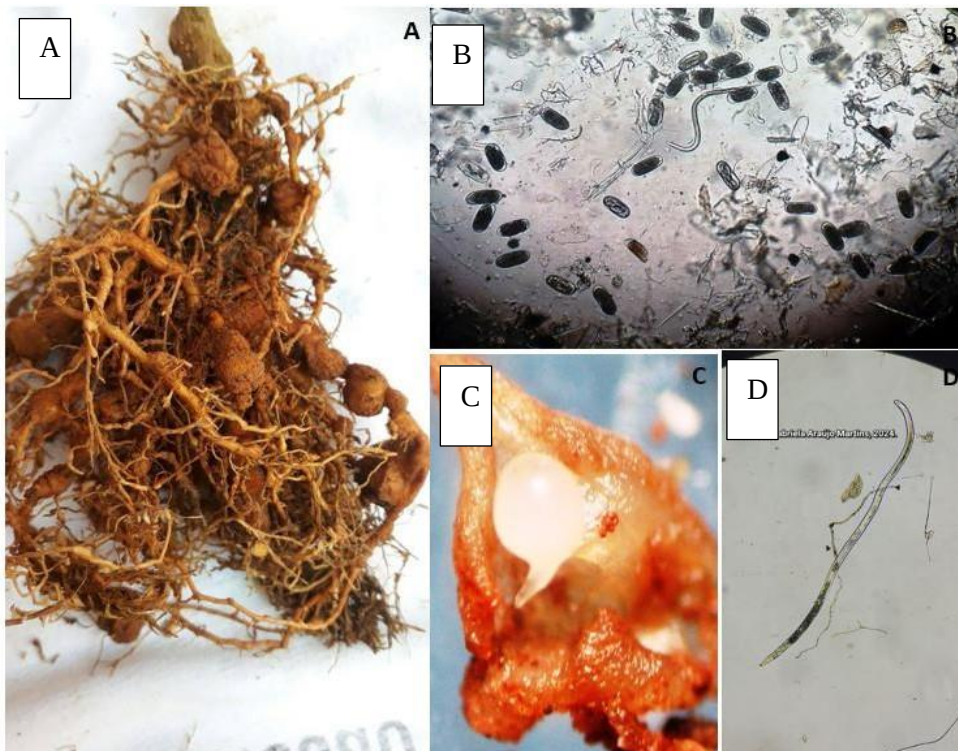
Aula prática 9: Método de extração de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp. para infestação de solo

9.1 Introdução

O método de Bonetti e Ferraz (1981) é amplamente utilizado na Nematologia para a extração de ovos de *Meloidogyne* spp. diretamente da superfície das galhas radiculares. Esses ovos são utilizados como inóculo em experimentos científicos, incluindo ensaios de infestação de solo e testes com hospedeiros diferenciadores de raças.

O procedimento consiste no corte das raízes infectadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm, seguido da trituração em liquidificador com potência de 600 W, utilizando uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% em água. Após a trituração, a suspensão obtida é filtrada por meio de uma peneira de 200 ou 230 mesh sobreposta a uma peneira de 500 mesh. O conteúdo retido na peneira de menor malha (500 mesh) é lavado com água corrente e os ovos são coletados com o auxílio de uma pisseta, concentrando-os para posterior uso em análises laboratoriais.

Figura 9.1 Nematóide de galhas, *Meloidogyne javanica*. A: galhas em raízes de giboma. B: Ovos e juvenis de 2º estágio. C: Fêmea exposta fora da raiz; D: macho de *Meloidogyne*.



Fonte: A-C: Silva, (2020). D: Araújo, (2020).

9.2 Objetivo

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

9.3. Realização da Aula Prática

9.3.1. Materiais e equipamentos

Balde com água,
Água (preferencialmente destilada),
Tesoura,
NaOCl 0,5 % (Hipoclorito de sódio a 0,5%)
Frasco de vidro com tampa (500 ml a 1 litro),
Peneira de 200 mesh com abertura de 0,074 mm,
Peneira de 500 mesh com abertura de 0,0254 mm,
Pisseta,
Béquero,
Funil,
Raízes com galhas (ex: jiloeiro).

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

9.4.1 Extração dos Nematoides das Raízes e Preparação de Inóculo

- 1º) Coletar o sistema radicular de plantas infectadas.
- 2º) Processar as raízes em liquidificador utilizando solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%.
- 3º) Filtrar a solução obtida através de um jogo de peneiras de 200 e 500 mesh. 1.4. Coletar a suspensão final contendo ovos e juvenis de nematoides.
- 4º) Transplantar as mudas para vasos. No sétimo dia após o transplante, inocular as plantas com uma suspensão contendo 5.000 ovos/juvenis de *Meloidogyne* spp.
- 4º) Estimar a quantidade de ovos/juvenis por mililitro utilizando microscópio óptico e lâmina de Peters.
- 5º) Aplicar o inóculo com pipeta em três aberturas de 3,0 cm de profundidade, distantes 2,0 cm do colo das mudas.
- 6º) Após 72 horas da inoculação, aplicar ácido pirolenhoso na superfície de cada vaso.
- 7º) Realizar avaliações 30 dias após a inoculação. Medir:

- Diâmetro foliar e altura da planta;
- Comprimento do caule com paquímetro digital e régua;
- Número de folhas;
- Peso fresco da parte aérea e do sistema radicular com balança analítica;
- Comprimento radicular com régua;
- Volume da raiz utilizando proveta de 1000 mL com volume fixo de 800 mL e emergindo a raiz para calcular o deslocamento.

9.4.2 Avaliação do Parasitismo

1º) Contar o número de galhas nas raízes utilizando lupa e contador manual.

2º) Determinar a massa de ovos em 10 g de raízes:

- Lavar as raízes em água corrente;
- Mergulhar as raízes em solução de fucsina ácida por 10 minutos;
- Visualizar e contar as massas de ovos. 5.3.

1º) Retire o sistema radicular do solo e mergulhe-o em balde com água agitando levemente, para retirar o excesso de solo aderido.

2º) Pique as raízes em pedaços de 1 a 2 cm 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*.

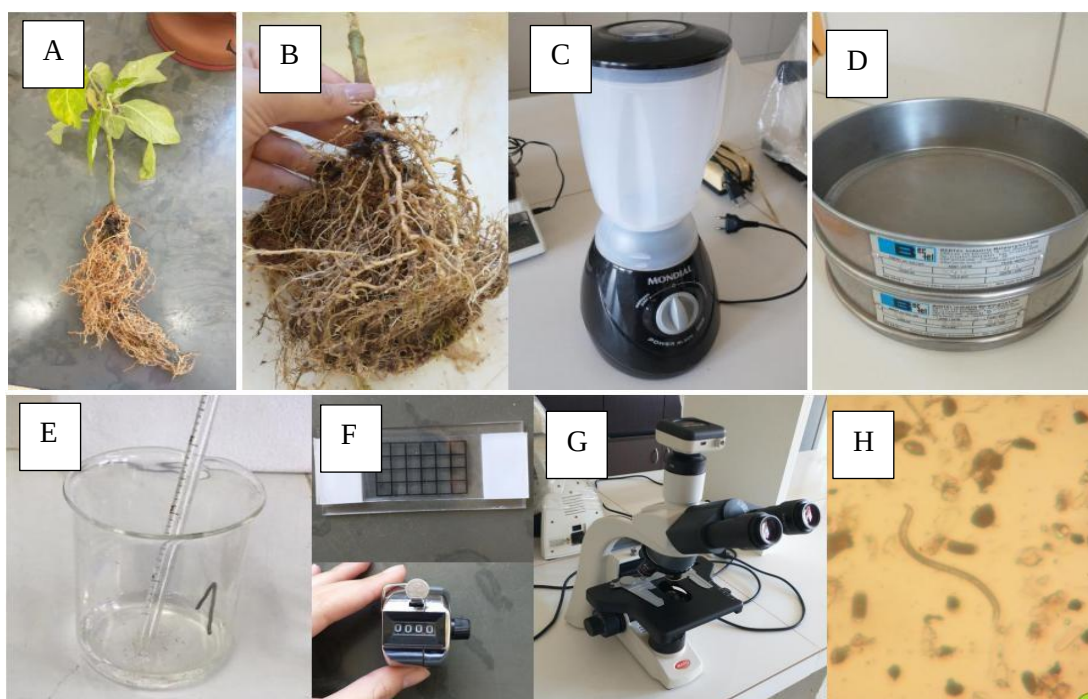
4º) Enxágue as raízes algumas vezes para retirar os ovos que restaram.

5º) Lave a peneira de 500 *mesh* com jatos d'água de pisseta e recolha os ovos em um copo ou béquer (Hussey, Barker, 1973). Os ovos retirados nesta última peneira podem ser utilizados para infestação de solo ou transferidos para funis de Baermann, visando à 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.

Figura 9.2 Passo do método de Boneti e Ferraz (1981).

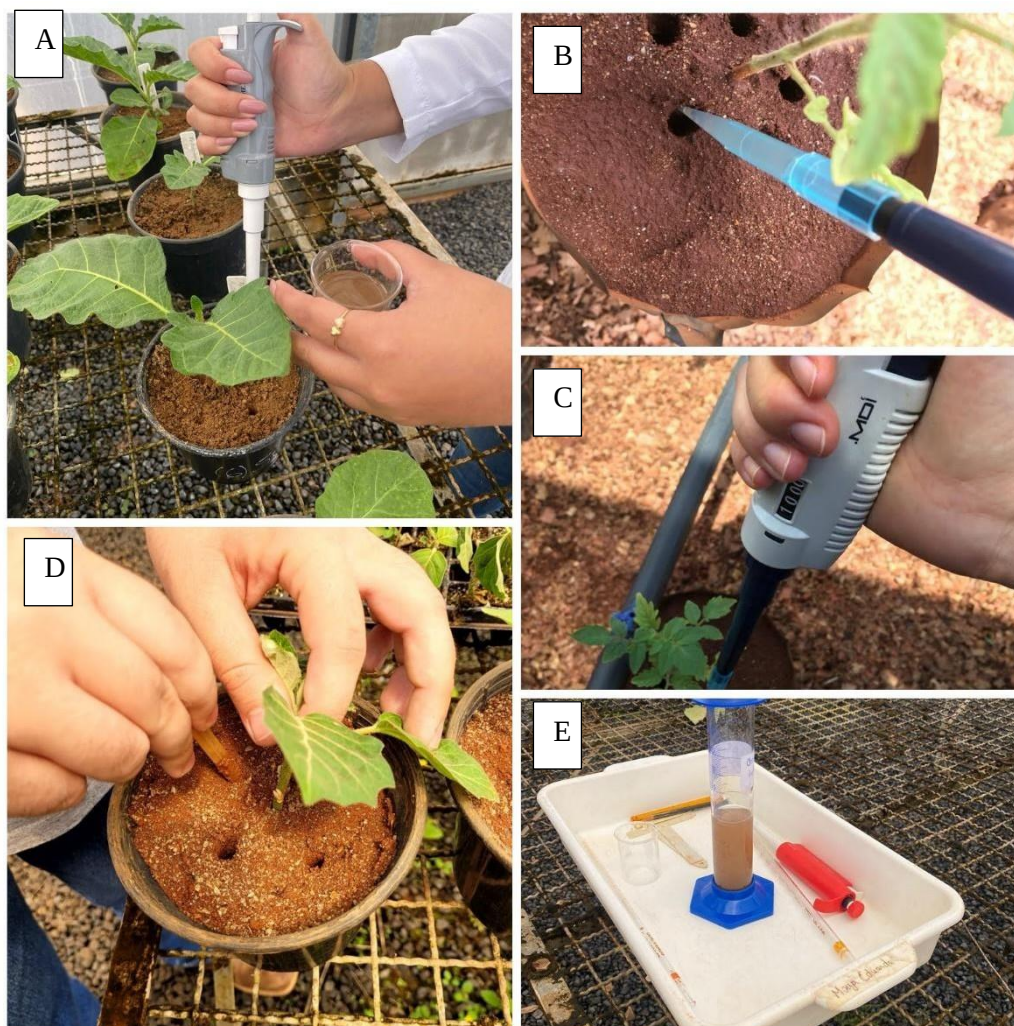


Inicia-se com a coleta (**imagem A**) e lavagem das raízes (**imagem B**), seguidas pela maceração no liquidificador (**imagem C**) e filtragem com peneiras (**imagem D**). A solução preparada (**imagem E**) é analisada em uma câmara de contagem (**imagem F**) e observada no microscópio (**imagem G**). O contador manual auxilia na quantificação, culminando na visualização dos nematoides na amostra (**imagem H**).

Fonte: Silva, (2020)

A Figura 9.2 ilustra um procedimento de inoculação de nematoides em uma planta jovem (J2), realizado em condições controladas de laboratório ou casa de vegetação. Esse processo é frequentemente utilizado em pesquisas agrônômicas para estudar a interação entre plantas e nematoides fitopatogênicos, que podem causar danos significativos às culturas agrícolas. Na imagem, uma pessoa manuseia uma pipeta automática para introduzir a solução contendo os nematoides diretamente no solo ao redor da planta, permitindo a infecção controlada e posterior análise dos efeitos na planta hospedeira. Esse tipo de experimento é essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo e controle desses organismos no campo.

Figura 9.3 – Processo de inoculação do nematoide do gênero *Meloidogyne* em mudas de jiloeiro e tomate.



A - Inicialmente, é realizado o preparo da suspensão contendo os juvenis de segundo estágio (J2) do nematoide. Essa suspensão é obtida por meio da extração dos nematoides do solo ou de raízes infectadas e é acondicionada em provetas e tubos, com auxílio de pipetas automáticas e pontas descartáveis, garantindo precisão na dosagem. B - Em seguida, o substrato onde estão as mudas é perfurado cuidadosamente com auxílio de um bastão ou outro instrumento adequado. C - Os orifícios são feitos ao redor da planta, próximos à rizosfera, de modo a permitir a aplicação direta da suspensão, sem danificar o sistema radicular. D - A inoculação é realizada utilizando pipetas automáticas, com a aplicação de volumes controlados da suspensão nos orifícios previamente feitos no substrato. E - A quantidade de inóculo varia de acordo com os objetivos do experimento, podendo, por exemplo, ser aplicada uma concentração de 2.000 J2 por planta. Após a aplicação, os orifícios são cobertos com o próprio substrato para garantir a umidade e evitar a perda da suspensão. As mudas são então firmemente posicionadas no vaso, assegurando o contato adequado entre as raízes e os nematoides.

A técnica de inoculação é essencial para estudos que visam compreender o ciclo de vida do patógeno, avaliar o comportamento de genótipos vegetais frente à infestação, e desenvolver estratégias de manejo integrado, além de fornecer material para experimentos subsequentes.

Fonte: Silva, (2020)

Atenção!!!

É importante controlar a potência do liquidificador e o tempo de trituração. De acordo com recomendações, deve colocar na menor potência do liquidificador, no nível 1. Vale ressaltar, que um tempo superior a 20 segundos pode gerar excesso de partículas na suspensão, dificultando a visualização e quantificação dos ovos. No entanto, para determinadas culturas,

como o café, pode-se aumentar esse tempo para até 30 segundos, visando uma extração mais eficiente. Apesar da presença de resíduos, com experiência no manuseio da técnica, é possível realizar a quantificação dos ovos sem grandes dificuldades (Zamboni, 2019).

Referências sugeridas:

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

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 84

HUSSEY, R. S.; BARKER, R. K. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

ZAMBONI, A. C. **Métodos em nematologia agrícola**. Machado, A. C. Z.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. C. B. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2019. 184 p.

Aula prática 10: Método para Obtenção de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio para Infestação de Solo (Calibração e Inoculação).

10.1. 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.

10.2. Objetivo

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

10.3. Realização da Aula Prática

10.3.1. Materiais e equipamentos

Raízes de plantas infectadas,

Água,

Peneira de 20 *mesh* com abertura de 0,841 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 10 cm de diâmetro.

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

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

10.4 Procedimentos

1º) Lave as raízes infectadas com *Heterodera glycines* ou *Meloidogyne* spp. usando água de torneira, vertendo o material sobre uma peneira de 20 *mesh* sobreposta a uma de 100 *mesh*. As fêmeas/cistos serão retidas na peneira de 100 *mesh*, de onde devem ser cuidadosamente recolhidos com jato de água para um *béquer*.

2º) Centrifugue a suspensão contendo os cistos em água por 2,5 minutos a $420 \times g$ (aproximadamente 1.750 rpm, dependendo da centrífuga), para eliminar resíduos pesados.

Descarte cuidadosamente o sobrenadante. Em seguida, ressuspensa o sedimento em solução de sacarose a 45% (615 g de sacarose/L de água) e centrifugue novamente por 60 segundos (1 minuto) na mesma velocidade. Após isso, decante o sobrenadante contendo ovos e J2 sobre uma peneira de 400 ou 500 *mesh*, lave bem com água para remover a sacarose e recolha os nematoides.

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, Schmitt, 1991).

10.5 Calibração e inoculação de *Meloidogyne* e *Heterodera*.

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.

10.5.1 Objetivo

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

10.5.2 Realização da Aula Prática

10.5.3 Materiais e equipamentos

Pipeta,

Câmara de Peters.

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

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

10.5.5 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 quadrados, 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.

A Figura 10.1 apresenta a utilização da lâmina de Peters para a contagem de ovos de *Meloidogyne* spp., um gênero de nematoides fitoparasitas responsáveis por grandes perdas em diversas culturas agrícolas. A câmara de Peters é um dispositivo de contagem amplamente utilizado em pesquisas nematológicas, permitindo a quantificação precisa de ovos e juvenis em amostras biológicas. O procedimento envolve a distribuição da amostra na lâmina, seguida da

observação microscópica e contagem sistemática das estruturas presentes. O uso do contador manual auxilia no registro eficiente dos dados, garantindo maior precisão na análise populacional desses organismos. Esse método é essencial para diagnósticos, estudos epidemiológicos e desenvolvimento de estratégias de manejo de nematoides em culturas agrícolas.

Figura: 10.1 - Representação esquemática da câmara de Peters usada para contagem usada para contagem de ovos de *Meloidogyne* spp. (Freitas, Neves, Oliveira, 2008).



A – Câmara de Peters: lâmina especial utilizada para contagem padronizada de ovos de nematoides. Cada quadrante (delimitado) da grade pode ser avaliado individualmente ao microscópio. Os "X" vermelhos indicam quadrantes selecionados para contagem.

B – Contador manual: equipamento utilizado para registrar o número de ovos observados durante a análise em cada campo visual da lâmina. Facilita a precisão e evita perdas de contagem durante o processo.

C – Ovos de *Meloidogyne* spp. ao microscópio: imagem microscópica mostrando ovos dispersos na lâmina, que serão contabilizados para estimar a população do nematoide na amostra analisada.

Fonte: Martins, (2024).

Referências sugeridas:

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

RIGGS, R. D.; SCHMITT, D. P. Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure. **Journal of Nematology**, Eaton Park, v. 23, n. 2, p. 149-154, 1991.

Aula prática 11: Preparação de Configurações Perineais - Método para Identificação de Espécies de *Meloidogyne* spp. (HARTMAN & SASSER, 1985).

11.1 Introdução

Muitas espécies de *Meloidogyne* são morfológicamente 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 10 fêmeas e observá-las ao microscópio de luz, para determinação da espécie.

11.2. 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.

11.3 Realização da Aula Prática

11.3.1 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;

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

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

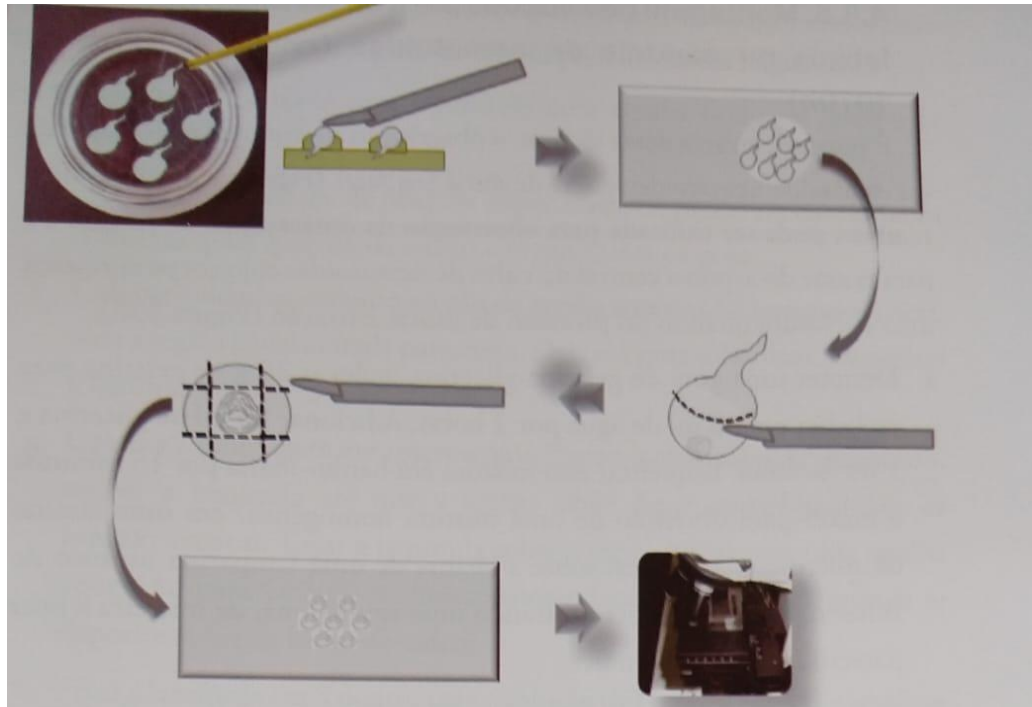
11.4 Procedimentos

A seguir, um passo a passo simplificado – de acordo com as diretrizes propostas por

Beneti e Ferraz (1981) – para a preparação de configurações perineais, que são essenciais para a identificação morfológica das espécies de *Meloidogyne* spp.:

- 1) **Seleção e Coleta das Fêmeas:** Recolha fêmeas adultas e em fase de postura (preferencialmente retiradas de raízes com galhas) por meio de extração (por exemplo, seguindo adaptações do método de Hussey & Barker, modificado por Boneti & Ferraz).
- 2) **Limpeza Inicial:** Lave cuidadosamente as fêmeas em água destilada para remover resíduos de tecido vegetal e detritos que possam interferir na visualização.
- 3) **Fixação:** Fixe os organismos utilizando um fixador apropriado (por exemplo, lacto fenol ou uma solução de formalina diluída) para preservar as estruturas cuticulares sem causar distorções morfológicas.
- 4) **Isolamento da Região Perineal:** Em ambiente limpo e sob o auxílio de um microscópio estereoscópico, posicione a fêmea e, com o auxílio de uma agulha fina ou bisturi, corte a região posterior que contém o perineal (área que abrange a vulva e o ânus).
- 5) **Limpeza do Padrão:** Remova os restos de tecidos internos e demais detritos que possam estar aderindo à cutícula perineal. Esse passo é crucial para revelar com clareza os sulcos, arcos e demais detalhes morfológicos usados na identificação.
- 6) **Montagem em Lâmina:** Transfira o recorte da região perineal para uma lâmina limpa. Adicione uma gota de meio de montagem adequado (por exemplo, lacto fenol-azul algodão ou glicerina) que favoreça o clareamento e a fixação do padrão.
- 7) **Cobertura e Selagem:** Cubra com uma lamínula e, se necessário, sele as bordas (por exemplo, com esmalte para unhas) para garantir a preservação e evitar a desidratação.
- 8) **Observação e Registro:** Analise o padrão perineal ao microscópio óptico, registrando as características morfológicas (como forma do arco dorsal, disposição e continuidade dos sulcos, e presença de incisuras laterais) que servirão de base para a identificação taxonômica da espécie.

Figura 11.1 - Diagrama ilustrativo do preparo de lâminas perineais de nematoides das galhas.



Fonte: Silva, (2020)

O procedimento envolve a disposição cuidadosa dos cortes perineais sobre uma gota de glicerina em lâminas de microscopia, garantindo que a cutícula fique voltada para cima. Em seguida, são realizados cortes ao redor da região perineal para remover o excesso de cutícula e destacar as estrias dessa região. Após a transferência das amostras para a lâmina, os cortes devem ser alinhados adequadamente para facilitar a observação microscópica. Os passos finais seguem o protocolo padrão para a montagem de lâminas permanentes, assegurando a preservação da estrutura perineal dos nematoides.

- **Seleção dos Nematoides Fêmeas:**
Coletar fêmeas adultas de *Meloidogyne* diretamente de raízes infectadas. Utilizar agulha de dissecação para transferi-las a uma placa de Petri com água.
- **Extração da Região Perineal**
Com auxílio de lâmina de barbear ou bisturi fino, realizar corte na região posterior do corpo da fêmea, separando a área perineal (contendo ânus e vulva).
- **Transferência para a Lâmina**
Depositar uma gota de glicerina sobre uma lâmina de microscopia. Posicionar cuidadosamente os cortes perineais na gota, com a **face da cutícula voltada para cima**.
- **Refinamento dos Cortes**
Com o auxílio de bisturi ou agulha, remover o excesso de cutícula ao redor da região perineal. Realizar cortes delicados para destacar as estrias e a área de interesse.
- **Alinhamento das Amostras**
Ajustar a posição dos fragmentos sobre a lâmina, agrupando-os de forma organizada. Assegurar a visualização clara sob o microscópio óptico.
- **Montagem Final**
Prosseguir com o protocolo de montagem de lâminas permanentes:
 - Colocar a lamínula com cuidado;
 - Fixar com esmalte ou outro selante apropriado;
 - Identificar e armazenar a lâmina adequadamente.

Figura 11. 2 - Configuração Perineal de *Meloidogyne incognita*



Fonte: Silva, (2020)

- **Localização Anatômica**
Região terminal do corpo da fêmea adulta.
Área observada sob microscopia ótica para fins taxonômicos.
- **Estruturas Principais**
 - **Ânus:** Abertura posterior, localizada centralmente na região perineal.
 - **Vulva:** Abertura genital, geralmente oval ou em fenda, situada abaixo do ânus.
 - **Estrias cuticulares:** Linhas concêntricas e onduladas que rodeiam a vulva e o ânus, importantes para a identificação da espécie.
- **Características Diagnósticas de *M. incognita***
Estrias geralmente finas, onduladas e contínuas.
Padrão perineal ovalado a ligeiramente quadrado.
Presença de sulcos laterais pouco evidentes ou ausentes.
Vulva com formato linear ou levemente arqueado.
- **Importância do Estudo**
Essencial para o diagnóstico preciso da espécie em laboratório.
Diferenciação de *M. incognita* de outras espécies do gênero *Meloidogyne*, como *M. javanica* ou *M. arenaria*.

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.

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

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. **Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology**. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Volume II. Methodology. Raleigh, North Carolina: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 69-77.

ZAMBONI, A. C. **Métodos em nematologia agrícola**. Machado, A. C. Z.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. C. B. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2019. 184 p.

Aula prática 12: Preparo de Lâminas- Método Para Preparo de Lâminas Temporárias com Espécimes de Nematoides (COBB, 1918).

12.1 Introdução

A identificação precisa de fitonematoides é fundamental para a agricultura sustentável e a segurança alimentar. Estes microrganismos, muitas vezes invisíveis a olho nu, causam perdas bilionárias anuais em cultivos agrícolas no Brasil e no mundo, atacando raízes e comprometendo a absorção de água e nutrientes. A correta identificação viabiliza o diagnóstico fitossanitário, permitindo diferenciar espécies patogênicas de benéficas ou de vida livre. Somente com identificação confiável é possível estabelecer estratégias de manejo direcionadas, como rotação de culturas, uso de variedades resistentes ou nematicidas específicos, evitando aplicações desnecessárias e reduzindo impactos ambientais. Além disso, é crucial para programas de quarentena vegetal, prevenindo a disseminação de espécies exóticas de alto risco. Ignorar essa etapa compromete todo o programa de manejo, agravando as perdas econômicas e ecológicas. Portanto, dominar técnicas de identificação é o alicerce para o manejo eficiente desses patógenos.

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. A amostra deve ser adequadamente fixada (geralmente com calor suave e formol) e montada em lâminas permanentes ou semipermanentes, em meio de montagem específico (como Glicerina, Ágar, FA 4:1 – 4 partes de formol para 1 parte de álcool, lactofenol). Isso é essencial para matar, fixar, clarear e "achatar" o nematoide, permitindo a visualização de estruturas internas.

12.2. Objetivo

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

12.3. Realização da Aula Prática

12.3.1. Materiais e equipamentos

Microscópio fotônico;

Estilete com ponta bem fina;

Placa de Petri pequena (5 cm de diâmetro);

Lâmina;

Lamínula;

Esmalte incolor, base para unhas ou parafinas;

Caneta para retroprojedor ou etiquetas;

Lamparina a álcool ou vela.

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.

12.3.3 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.

12.4 Procedimentos

1º) Coloque a suspensão obtida em tubo de ensaio e deixe decantar por pelo 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) Etiqueta para a identificação da lâmina.

7) Colocar a lâmina no microscópio fotônico e observar as estruturas do nematoide

8) Verificar se o nematoides tem estilete

9) Observar o tipo de estilete;

10) observar o tipo de cutícula;

11). Observar o tipo de esôfago;

- 12) observar órgão sexuais do nematoide: vulva e espículas;
- 13) Observar o tipo de cauda dos nematoides.

Figura 12.1 - Materiais utilizados no preparo de lâminas temporárias com espécimes de nematoides, conforme o método de Cobb (1918).



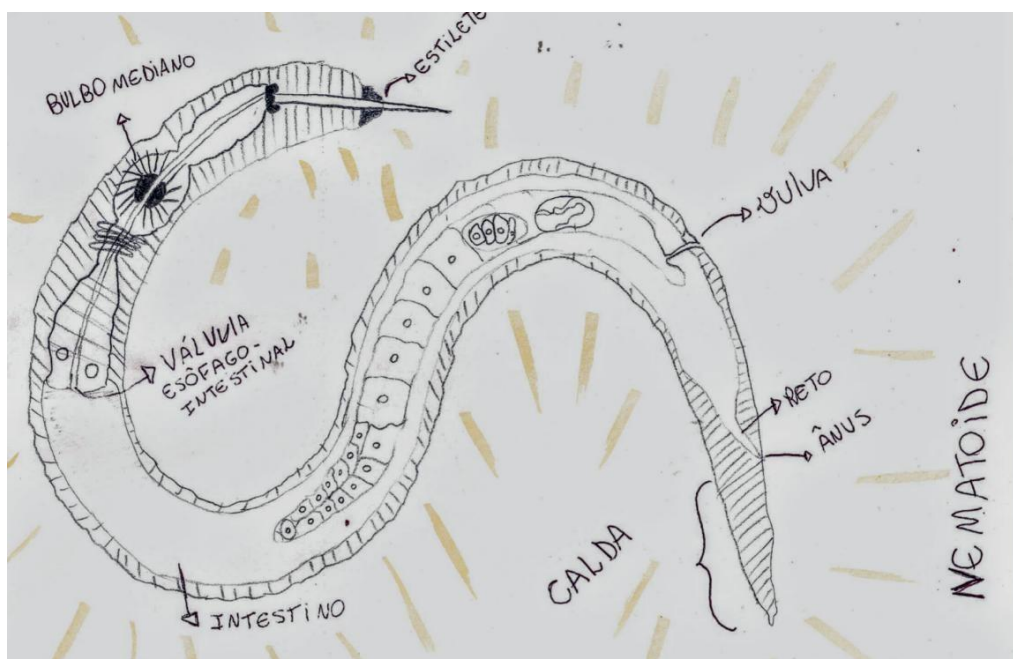
Fonte: Silva, (2016)

Figura 12.2 - Etapas do método de Cobb (1918) para o preparo de lâminas temporárias com espécimes de nematoides, incluindo manipulação, observação e transferência para lâminas.



Fonte: Silva, (2016)

Figura 12.3 - Nematóide fitopatogênico com as suas principais estruturas identificadas.



Fonte: Silva, (2024)

Atenção!

Lembre-se: A identificação ao nível de espécie frequentemente requer a observação detalhada e integrada de múltiplos caracteres, especialmente os da região cefálica, esofágica, reprodutiva e caudal. O detalhamento da amostra (hospedeiro, local, sintomas) também fornece pistas importantes. Para grupos complexos, técnicas moleculares podem ser necessárias para confirmação.

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, D. **Nematologia agrícola**. In: **Métodos de coleta de amostras de solo e raízes para análises**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV, 1989. cap. 1, p. 28-33.

FASSULIOTIS, G. Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: LAMBERT, F.; TAYLOR, C. E. (ed.). **Root-knot nematode (*Meloidogyne* species): systematics, biology and control**. London: Academic Press, 1979. p. 425-453.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Nematologia Agrícola desempenha um papel fundamental para a difusão de informações para o manejo de fitonematoides, que afetam diversas culturas de interesse econômico. No entanto, a disseminação do conhecimento sobre esses organismos ainda enfrenta desafios, principalmente pela falta de materiais didáticos específicos e pela complexidade de sua observação em condições naturais.

A elaboração deste guia de práticas visa preencher essa lacuna, oferecendo um conteúdo estruturado que auxilia professores e estudantes na compreensão e aplicação dos principais métodos de estudo dos nematoides. A prática em laboratório, associada a um ensino teórico bem fundamentado, permite que os alunos desenvolvam habilidades técnicas essenciais para a identificação, quantificação e manejo desses organismos, tornando-os mais preparados para enfrentar desafios na área agrícola.

Além disso, a disponibilização deste material didático contribui para a democratização do conhecimento, permitindo que instituições de ensino com diferentes níveis de infraestrutura possam utilizá-lo como um guia prático. Dessa forma, espera-se que este trabalho incentive novas pesquisas na área e promova o aperfeiçoamento contínuo das técnicas utilizadas no estudo dos fitonematoides.

Com o avanço das tecnologias e o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de nematoides, é imprescindível que a formação de futuros profissionais da agronomia contemple abordagens práticas e acessíveis. Assim, este manual representa um passo importante para o fortalecimento do ensino de Nematologia, proporcionando uma base sólida para que estudantes e pesquisadores possam aprofundar seus estudos e contribuir para a sustentabilidade da produção agrícola.

Espero que este material seja utilizado como material básico nas disciplinas de nematologia a nível de graduação e pós-graduação e referência útil e prática para os estudantes de iniciação científica e os demais públicos interessados no tema.

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.
- BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von Ankylostomum (nematoden) larven in erdproben. **Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië**, v. 57, p. 131-137, 1917.
- 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 soil biology: sampling and characterization of below-ground biodiversity**. London: Earthscan, 2008. p. 97-106.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 553, 1981.
- 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.
- BYRD, Jr., D. W.; KIRKPATRICK, J.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 142- 143, 1983.
- CAPELETTO, A. **Biologia e educação ambiental: roteiros de trabalho**. São Paulo: Ática, 1992.
- CARES, J. E.; HUANG, S. P. Soil nematodes. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J. (Ed.).
- CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XII, 1988, Dourados, MS. **Resumos**.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. State Agricultural Research Centre-GHENT, Belgium, 1972. 77 p.
- DECRAEMER, W.; HUNT, D. J. Structure and classification. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Ed.). **Plant Nematology**. Wallingford, Oxfordshire, Reino Unido: CAB International, 2006. p. 3-32. Dourados, MS, 1988. p. 7.
- DUNN, R. A. Extraction of cysts of *Heterodera glycines* from soils by centrifugation in high-density solutions. **Journal of Nematology**, v. 1, p. 7, 1969.
- FASSULIOTIS, G. Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: LAMBERT, F.; TAYLOR, C. E. (ed.). **Root-knot nematode (Meloidogyne species): systematics, biology and control**. London: Academic Press, 1979. p. 425-453.
- FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: NORMA EDITORA, 2016. 251 p. ISBN 978-85-99031-26-1.
- FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 84 p. (Cadernos Didáticos, 58).
- GONZAGA, V. G.; OLIVEIRA, C. M. G. **Ditylenchus destructor Thorne (Tylenchida: Anguinidae)**. In: Priorização de Pragas quarentenárias ausentes no Brasil, p. 277-291, 2018.

GOULART, A. M. C. *et al.* **Coleta de amostras para análise de nematoides: recomendações gerais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. **Handbook of tropical soil biology: sampling and characterization of below-ground biodiversity**. London: Earthscan, 2008. p. 97-106.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. **Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology**. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Volume II. Methodology. Raleigh, North Carolina: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 69-77.

HUSSEY, R. S.; BARKER, R. K. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

INSTITUTO FEDERAL GOIANO. **Método de decantação, peneiramento e funil de Baermann – High quality and size**. Direção de Milton Lima. Urutaí-GO, 2011. Color. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=ClOoxU75BcE>. Acesso em: 10 jan. 2025.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Journal of Nematology**, Eaton Park, v. 23, n. 2, p. 149-154, 1991.

LIMA, H. B. S. *et. al.* **Estudo da influência da sedimentação gravitacional da lama vermelha na resistência a chamuscas de Compósitos Poliméricos**. In: Processos Químicos e Biotecnológicos – Volume 4: Editora Poisson – Belo Horizonte - MG: Poisson, 2020.

MACHADO, A.; FERRAZ, L.; SILVA, S. **Métodos em Nem. Agrícola**. Brazilian Nematological Society. ISBN: 978-65-80897-00-1, 2019.

MIZOBUTI, E. H. **Caracterização da resistência da linhagem L2300 de feijoeiro a *Heterodera glycines***. 2001. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001. Orientador: Silamar Ferraz. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, Everaldo Gonçalves de Barros e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

NOVARETTI, W. R. T. **Coleta de amostras de raízes e solo para análise nematológica**. Campinas-SP, 2011. 31 p.

OLIVEIRA, C. M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO, L. H. S. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas, SP: Millennium, 2016.

PINHEIRO, J. B. **Nematoides em hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa, 2017.
SONDATERRA. Manual de instruções. Piracicaba – São Paulo, 2017. **Plant Disease Reporter**, v. 48, p. 692, 1964.

RIGGS, R. D.; SCHMITT, D. P. Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure.

SOUZA JR. *et al.* Eficiência de diferentes métodos de extração de *Meloidogyne* spp. na cultura da aceroleira. **Científic@ Multidisciplinary Journal**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1-8, 2020.

SOUZA, R. M.; DEL VALLE, E. E.; SILVA, R. M. G. O status do ensino de nematologia nos cursos de Agronomia e Engenharia Agrônômica no Brasil, 2012.

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

TIHOHOD, D. **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, D. G.; VAZ, L. S. B. Metodologias para estudo e diagnóstico de nematoides parasitas de plantas do Brasil. In: **CONVIBRA ONLINE CONFERENCE**, 2014. *Anais [...]*. 2014.

ZAMBONI, A. C. **Métodos em nematologia agrícola.** Machado, A. C. Z.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. C. B. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2019. 184 p.