

**Efeito de três Diferentes Condições de Armazenamento de Amostras de Campo para Análise Nematológica, sobre a Recuperação de Nematóides do Solo e Raízes pelas Metodologias de Baermann (1.917), Jenkins (1.964), Coolen & D'herde (1.972)**

Daniele Aparecida COSTA

Associação Cultural e Educacional de Garça – Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal

Carlos Eduardo de Mendonça OTOBONI

Associação Cultural e Educacional de Garça – Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal Regiani de Fátima

SARAIVA

Associação Cultural e Educacional de Garça – Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal

## **RESUMO**

O objetivo desse estudo foi avaliar possíveis diferenças de três formas de armazenamento (ambiente, refrigerador e freezer) sobre a recuperação de nematóides, com o emprego das metodologias laboratoriais de rotina, Baermann (1917), Jenkins (1964) e Coolen & D'Herde (1972). Foram coletadas 36 amostras de solo e raízes de área de café naturalmente infestadas por nematóides, com umidade natural. As amostras foram divididas nas três condições de armazenamento sendo que cada condição possuiu 12 amostras que permaneceram 45 dias nas respectivas condições (ambiente aproximadamente 25° C, refrigerador 10° C e freezer – 20° C). As amostras foram processada e observou-se pelos resultados que o método de Jenkins foi mais eficiente na recuperação dos nematóides do solo do que o método do funil de Baermann sendo a condição de armazenamento no refrigerador a mais efetiva. O método de Coolen & D'Herde também foi mais eficiente que o método de Baermann para a extração dos nematóides nas raízes.

## **SUMMARY**

The aim of project was te evaluate the possible differences of three types of storage (environment, refrigerator and freezer) upon the recovery of nematodes utilizing the laboratory routine methodologies of Baermann (1917), Jenkins (1964) and Coolen & Dø Herde (1972). Trirty-six different samples of soil and roots of an infected area of coffee plantation were collected with natural humidity. The samples were divided in three different types of storage. Twelve samples were placed in each type of storage. They remained for 45 days under the respective condition (environment, approximately 25°C, refrigerator 10°C and freezer –20°C). The samples were processed and the results were the following: the Jenkins methodology was more efficient in the recovery of soil nematodes than the funnel methodology of Baermann and

the storage in the refrigerator was the most effective. The methodology of Coolen & Dç Herde was also more efficient than Baermann's for the extraction of root nematodes.

## 1. INTRODUÇÃO

Os nematóides são microrganismos que vivem no solo e nas raízes das plantas em áreas cultivadas, como também em ambientes naturais. Estão relacionados entre os animais multicelulares mais numerosos do mundo (LORDELLO, 1984).

Nas rotinas laboratoriais é necessária a extração dos nematóides de amostras de solo e raízes para a quantificação e qualificação dos mesmos e posteriormente a emissão de um laudo nematológico com a descrição do problema potencial fitonematológico na área e/ou cultura amostrada.

Para tanto é fundamental que a amostragem, o processo de armazenamento das amostras e a extração nematológica, com o emprego das metodologias específicas, sejam estáveis para a melhor fidelidade do resultado obtido e da recomendação técnica para o manejo e/ou controle dos nematóides.

As amostras geralmente são mantidas em armazenamento em refrigerador a aproximadamente 10°C (TIHOHOD, 1992). Todavia não se sabe ainda sobre os efeitos da temperatura de armazenamento das amostras em relação às metodologias de extração de nematóides de solo e raízes empregadas rotineiramente.

Foi objetivo desse estudo avaliar possíveis diferenças de três diferentes formas de armazenamento sobre a recuperação de nematóides com o emprego das metodologias laboratoriais de rotina.

(PINHEIRO et al.1994). Observaram que todos os tratamentos erradicaram *Ditylenchus* sp, das sementes de arroz, mas o melhor tratamento foi o T1 (95°C/4hrs) porque foi o que apresentou o poder germinativo (PG-96%) e o vigor (V-96%) próximos aos da testemunha. Os demais tratamentos apresentaram um decréscimo no PG e V das sementes T2 -92,5 e 92,5%. T3 88 e 90%, T4-92 e 92,5% e T5-88 e 90,5%, respectivamente.

(JAHEN 1992). Constatou que a duração do ciclo biológico total foi de 44, 36,32 e 24 dias nas temperaturas de 20, 24, 28,32 °C e na temperatura de campo respectivamente, o ciclo do nematóide foi afetado pela temperatura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de solo e raízes de área de café naturalmente infestada por nematóide(s), com umidade natural.

As amostras foram coletadas a uma profundidade de 0 a 25 cm, com o auxílio de um enxadão. Foram misturadas e acondicionadas em sacos plásticos resistentes, bem fechados e devidamente identificados.

a. Montagem Experimental

No laboratório as amostras foram subdivididas em 36 amostras semelhantes, contendo aproximadamente 200gr de solo e 10gr de raízes. Estas amostras foram divididas nas três condições de armazenamento, sendo que cada condição possuísse doze amostras, sendo analisadas em seguida os seguintes tratamentos.

- T1- Baermann + ambiente natural
- T2- Baermann + refrigerador
- T3- Baermann + freezer
- T4- Jenkins, Coolen & D'Herde + ambiente natural
- T5- Jenkins, Coolen & D'Herde + refrigerador
- T6- Jenkins, Coolen & D'Herde + freezer

b. Extração dos Nematóides

Após 45 dias de manutenção das amostras nas diferentes condições de armazenamento, as amostras foram processadas pelas metodologias de BAERMANN (1.917), JENKINS (1.964), COOLEN & D'HERDE (1.972), separadamente.

## **2.2. QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DOS NEMATÓIDES**

Depois de obtida a suspensão final de 4ml com nematóides, uma alíquota de 1 ml foi retirada e colocada em lâmina de contagem e levada à microscopia óptica compatível para a quantificação e identificação dos nematóides.

## **3. RESULTADO E DISCUSSÃO**

Observou-se pelos resultados obtidos que o T6 (Jenkins) (Tabela 1) foi o mais eficiente na recuperação de nematóides do solo. Comparado aos tratamentos T3 (Baermann/Freezer) e T1 (Baermann/ambiente natural) houve um decréscimo significativo na recuperação dos nematóides, sinalizado pelo teste de Duncan ( $P=0,01$ ). Todos os demais tratamentos também diferiram significativamente do T3 (Baermann/Freezer) na extração dos nematóides do solo, mostrando que esta condição de armazenamento afetou negativamente a atividade dos nematóides na amostra, que é fundamental para a extração dos nematóides nesta metodologia.

Tabela 1. Médias da recuperação nematológica das amostras de solo e raiz de cafeeiros naturalmente infectados, mantidas em diferentes condições de armazenamento com o uso das metodologias de BAERMANN (1917), JENKINS (1964) e COOLEN & D'HERDE (1972).

Extração de Nematóides de Solo		Extração de Nematóides de Raiz		Extração de Nematóides de Solo + Raiz	
Tratamento	Média	Tratamento	Média	Tratamento	Média
6	3.7988* a	6	1.7823 b	6	4.2545 a
5	3.7284 ab	5	3.2099 a	5	4.9084 a
4	3.5529 ab	4	3.0329 a	4	4.6857 a
2	3.3288 ab	2	3.4010 a	2	4.7131 a
1	2.8418 b	1	3.6953 a	1	4.6932 a
3	1.8856 c	3	1.5466 b	3	2.5184 b

dados transformados em  $(X + 0,5)^{1/2}$  – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P=0,01).

Nas raízes, os tratamentos T1, T2, T5 e T4 foram mais eficientes na extração dos nematóides, sendo significativamente diferentes dos tratamentos T3 e T6. Portanto, deve-se destacar o efeito negativo do tratamento no freezer para ambas as metodologias de extração dos nematóides, COOLEN & D'HERDE (1.972) no T6 e BAERMANN (1.917) no T3.

Na análise com a soma dos resultados de solo e raiz, observou-se que o T5 (Jenkins & Coolen D'Herde/Refrigerador) foi o mais efetivo no conjunto, embora tenha diferido significativamente apenas do tratamento T3. Isto coincide com as recomendações técnicas de armazenagem das amostras preconizadas pelos Laboratórios de Nematologia. Com efeito, tal parâmetro tem sido utilizado para a tomada de decisão sobre estratégias de manejo e/ou controle dos nematóide em uma lavoura de café, portanto a adoção do tratamento T3 para a análises nematológica poderia comprometer tal decisão.

Pela Figura 1, observou-se nitidamente o efeito da condição de armazenamento das amostras sobre a extração dos nematóides. Notou-se que a variação condições de armazenagem afetaram principalmente a metodologia de BAERMANN (1.917), destacando-se o efeito decrescente de extração dos nematóides das raízes a medida que a condição de armazenagem decresceu em relação à temperatura.

A extração de nematóides com a metodologia de JENKINS (1.964) não foi afetada pela condição de armazenagem, sendo observada apenas um pequeno acréscimo na recuperação dos nematóides a medida que a temperatura diminuía, assim, o tratamento T6 foi o mais efetivo na recuperação dos nematóides no solo.

Já para COOLEN & D'HERDE (1.972), extração dos nematóides em raízes, foi observado que, entre as condições de ambiente natural e refrigerador, não houve diferenças significativas na recuperação dos nematóides, entretanto, quando a amostra foi mantida em freezer houve um decréscimo significativo dos nematóides recuperados.

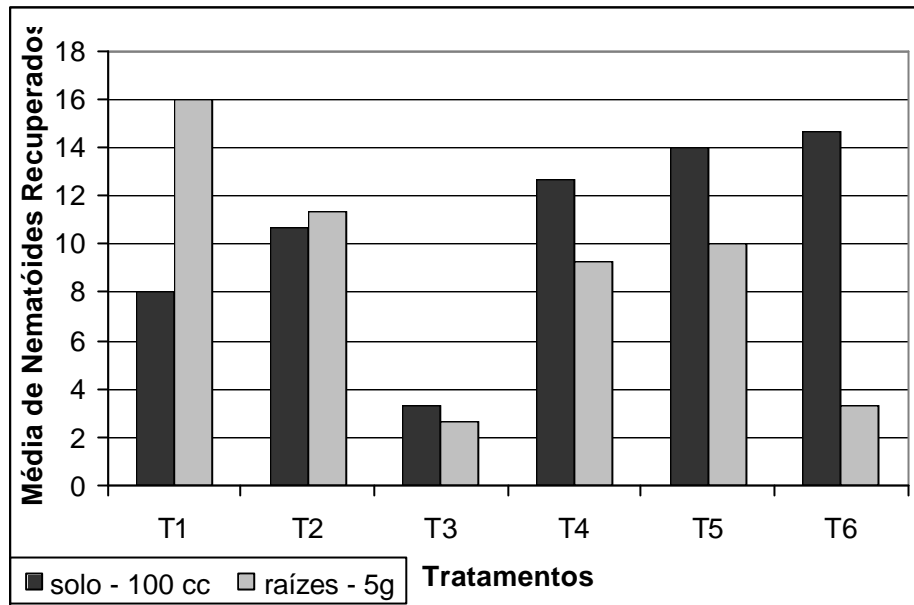


Figura 1. Comparação da média de recuperação de nematóides nas amostras de solo e raízes processadas por diferentes formas, sendo: T1, Baermann + ambiente natural; T2, Baermann + refrigerador; T3, Baermann + freezer; T4, Jenkins, Coolen & D'Herde + ambiente natural; T5, Jenkins, Coolen & D'Herde + refrigerador; T6, Jenkins, Coolen & D'Herde + freezer.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados das médias de recuperação de nematóides verificou-se que o método de Jenkins + Refrigerador (T5) em amostras de solo recupera maior número de nematóides.

Não se deve armazenar amostras em condições de freezer para a extração de nematóides de amostras pelas metodologias de COOLEN & D'HERDE (1.972) e BAERMANN (1.917).

A variação na temperatura de armazenamento afetou significativamente a recuperação dos nematóides nas amostras.

A metodologia de BAERMANN (1.917) foi a mais afetada pela variação na condição de armazenamento das amostras.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAERMANN, G. Eine einfache Methode Zur **Auffindung von Ankvlostomum (nematoden) Larven** in Erdproben. *Tijdschr. Ned.-Indie*, v.57, 1917. p.131-137.

CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XVI, 1992, Lavras - MG. Efeito da temperatura na biologia da raça 2 de **Meloidogyne incognita em mucuna preta**. Faculdade de Ciências Agrárias: UNESP, 1992. 78p.

CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XVIII, 1994, Campinas – SP. **Eradicação de Ditylenchus sp. em sementes de arroz.** CENARGEN – EMBRAPA: Brasília – DF, 1994. 33p.

COOLEN, W. A., D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extration of nematodes from plant tissue.** State Agriculture Research Center – GHENT, Belgium. 1972. p.77.

DIAS, W. P., FERRAZ, S. **Crescimento e Esporulação de Arthobotrys spp. Em diferentes substratos, meios de cultura, níveis de temperatura e pH inicial em meio não-tamponado.** In: *XVII Congresso Brasileiro de Nematologia*, Jaboticabal, 1993. p.69.

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

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas** 8 ed. São Paulo: Nobel, 1984. p.314.

TIHOHOD, D. **Nematologia Agrícola Aplicada** . Jaboticabal: FUNEP, 1993. p.372.