

EFICIÊNCIA DE SEIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE NEMATÓIDES, DE DIFERENTES GÊNEROS, DE TRÊS TIPOS DE SOLO^{1/}

Maria de Lourdes Mendes ^{2/}
Silamar Ferraz ^{2/}
Adair José Regazzi ^{3/}

1. INTRODUÇÃO

As diferentes técnicas de extração de nematóides dos seus substratos variam em eficiência, tanto qualitativa como quantitativamente. Alguns métodos são mais eficazes para determinada espécie de nematóide ou substrato, enquanto outros são mais convenientes para fins específicos, como inspeção em viveiros ou execução de medidas de quarentena (3). A textura do solo, dentre outros fatores, tem sido, freqüentemente, relacionada com a eficiência dos métodos de extração, constituindo objeto de muitas investigações (10, 12, 22, 23, 26). Visando a obtenção de resultados mais satisfatórios, pesquisadores desenvolveram técnicas e aparelhos ou introduziram modificações nas técnicas já conhecidas (4, 5, 6, 7, 19, 20, 21).

No método de extração, devem-se considerar vários aspectos. OOSTENBRINK (15) listou importantes características dos nematóides que afetam a metodologia de extração, destacando o tamanho e a coloração diferencial, a resistência mecânica, o formato e o peso específico. Segundo RICKARD e BARKER (16), o tamanho e a coloração diferencial são importantes para métodos qualitativos,

^{1/} Parte da tese de mestrado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa.

Aceito para publicação em 25-8-1987.

^{2/} Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. 36570 Viçosa, MG.

^{3/} Departamento de Matemática da Universidade Federal de Viçosa. 36570 Viçosa, MG.

como a microscopia direta; a resistência mecânica é crítica para a eficiência dos métodos que empregam liquidificador; o tamanho e o formato são importantes para o uso de peneiras, enquanto o peso específico influí na eficiência dos métodos que envolvem flutuação, centrifugação, decantação e elutrião.

As técnicas que levam em conta a motilidade total ou parcial dos nematóides (métodos de Baermann e Cobb, suas combinações e, ou, modificações) têm a vantagem de serem simples e de fácil execução. Ademais, não alteram o comportamento dos nematóides, como pode ocorrer com a técnica de centrifugação, em virtude da pressão osmótica dos líquidos de separação (23). Formas que se movem ativamente podem ser extraídas pelo método de Baermann e suas variantes. Algumas dessas variantes envolvem o uso de placas de Petri ou bandejas, em vez de furos (23, 24). Combinações peneiramento-funil de Baermann, funil de Baermann-câmara de nevoeiro ou flutuação-filtro de algodão também têm sido usadas (3, 11, 18). Por outro lado, há técnicas que são adaptadas tanto para formas móveis como imóveis, como os métodos de decantação e peneiramento de Cobb, flutuação-peneiramento, flutuação centrifuga e elutrião (3, 4, 6, 7, 8, 13).

O presente trabalho visa comparar a eficiência de alguns métodos na extração de nematóides de solos de classes texturais diferentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados solos de três classes texturais: franco-arenosa, muito argilosa, coletadas no campus da Universidade Federal de Viçosa, e argilo-arenosa, obtido pela mistura de partes iguais dos dois primeiros. As amostras provenientes do campo foram totalmente homogeneizadas em misturador manual (cinco quilos de capacidade), passadas em peneira comum de 5 mm de abertura de malha, secas ao sol e levadas ao forno de Pasteur, a 70°C, aí permanecendo até peso constante. Em seguida, misturaram-se os solos originais com o misturador manual, para a obtenção da textura argilo-arenosa. A mistura e os solos originais foram submetidos às análises química e granulométrica (Quadros 1 e 2). A capacidade máxima de retenção de água de cada um deles foi determinada pelo método de ALLEN (1), e a ausência de nematóides foi confirmada, processando-se três amostras de cada textura pelo método de flutuação centrífuga em solução de açúcar (13). As amostras, divididas em subamostras de 50g, foram acondicionadas em sacos plásticos e infestadas, individualmente, com 500 ± 10 espécimes de *Tylenchorhynchus Cobb*, 1913, *Helicotylenchus Steiner*, 1945, *Nothocriconema De Grisse e Loof*, 1975, e 250 ± 10 larvas de segundo estádio de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, contidos em volume de água suficiente para manter as amostras em 40% da capacidade máxima de retenção de umidade. Após a infestação, as amostras foram armazenadas em câmara de crescimento, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, por período de 24 a 48 h, e, então, processadas pelos seguintes métodos de extração:

(i) Funil de Baermann: as subamostras foram processadas como descrito por Flegg e Hooper (1970), citados por MENDES *et alii*. (14).

(ii) Baermann, modificado por WHITHEAD e HEMMING (24): fina camada de solo (subamostra de 50g) foi distribuída sobre camada dupla de papel facial («Scottys»), apoiada sobre tela de náilon, numa bandeja de plástico (34 x 28 x 5 cm). A seguir, com piseta, adicionou-se pequena quantidade de água, suficiente para tocar a camada de papel e umedecer o solo (Figura 1). Ao final de 24 h, removeu-se, com cuidado, o conjunto tela de náilon + solo e coletou-se a suspensão

QUADRO 1 - Análise química dos diferentes tipos de solo utilizados como substrato na extração de nematóides. UFV, Viçosa, MG, 1986^{1/}

Classes Texturais	pH em água (1:2,5)	ppm		eq.mg/100g de solo		
		P	K	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Al ⁺⁺⁺
Franco-arenoso	5,2	3,0	46,0	3,0	0,7	0,1
Muito argiloso	4,4	1,0	10,0	0,0	0,0	0,0
Argilo-arenoso	4,8	1,0	26,0	1,4	0,3	0,2

1/ Análises efetuadas pelo Laboratório de Fertilidade de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

QUADRO 2 - Análise granulométrica dos diferentes tipos de solo utilizados como substrato na extração de nematóides. UFV, Viçosa, MG, 1986^{1/}

Classes texturais	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)
Franco-arenoso	71,00	11,00	18,00
Muito argiloso	28,00	7,00	65,00
Argilo-arenoso	49,00	9,00	42,00

1/ Análise efetuada pelo Laboratório de Fertilidade de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

de nematóides em bêquer de 250 ml, lavando-se a bandeja com jato de água de piseta. Deixou-se sedimentar por 12 h e reduziu-se o volume para 10 ml, por sifonação.

(iii) Decantação e Peneiramento de Cobb, como descrito por THORNE (18): colocou-se cada subamostra de solo (50g) em balde de plástico (cinco litros de capacidade), adicionaram-se dois a três litros de água de torneira e misturou-se completamente. Após cerca de 20 seg de repouso, verteu-se a suspensão, através de peneira de 20 mesh, em outro balde. A operação foi repetida com o solo remanescente no primeiro balde e o peneirado foi coletado no segundo balde. A suspensão do segundo balde foi, então, passada através de uma série de peneiras (60, 100, 200, 325 e 400 mesh), coletando-se os resíduos das peneiras em bêquer, com o auxílio de piseta (Figura 2). Após 12 h de repouso, reduziu-se o volume para 10ml, por sifonação.

(iv) Decantação e Peneiramento de Cobb combinado com o Funil de Baermann, conforme descrito por THORNE (18): colocou-se cada subamostra de solo (50g) em balde plástico (cinco litros de capacidade), adicionaram-se, aproximadamente, dois a três litros de água de torneira, misturou-se completamente e deixou-se decantar por cerca de 20 seg. A seguir, a suspensão foi passada através

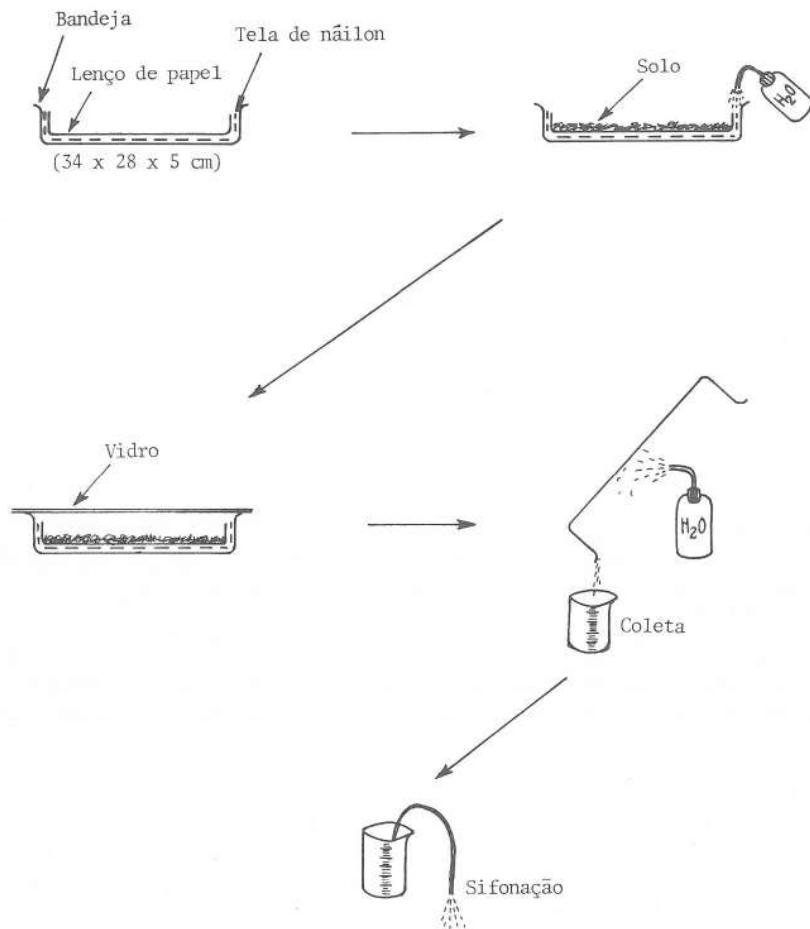


FIGURA 1 - Método de Baermann modificado, usando-se bandejas (WHITEHEAD e HEMMING, 1965).

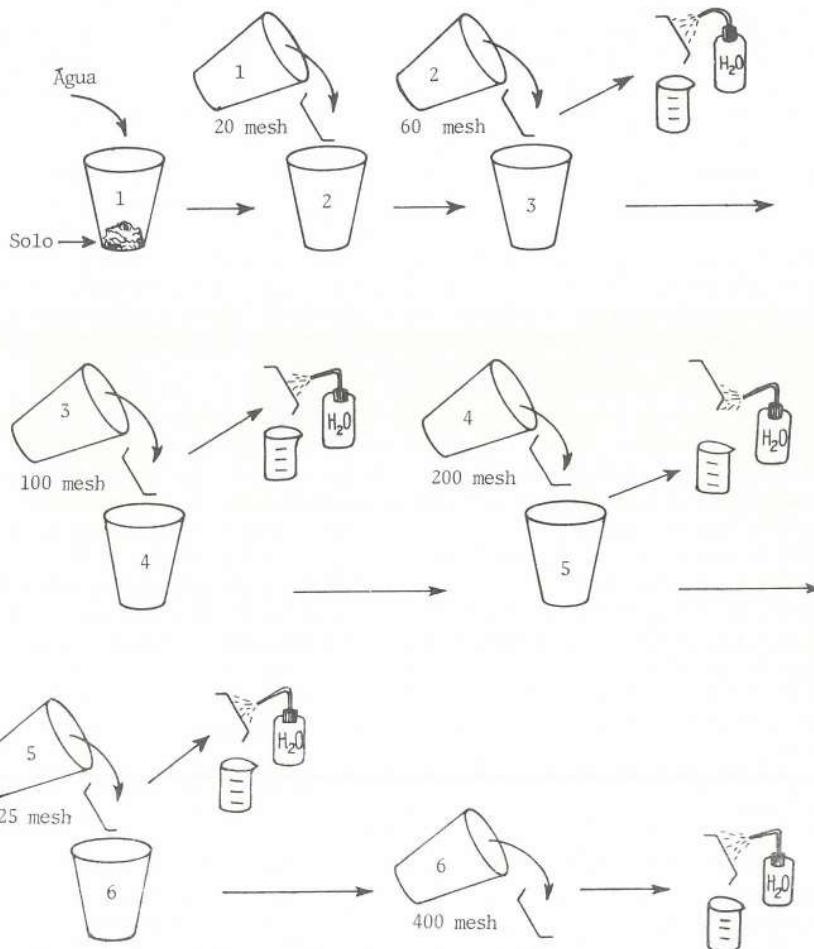


FIGURA 2 - Método de decantação e peneiramento de Cobb (Segundo THORNE, 1961).

de peneira de 20 mesh e o peneirado recolhido em outro balde. Repetiu-se a operação com o solo remanescente no primeiro balde, coletando-se a suspensão no segundo. Essa suspensão do segundo balde foi vertida através de peneira de 325 mesh e os resíduos coletados em bêquer de 100ml, com piseta. O bêquer foi coberto com folha dupla de lenço de papel («Scottys») + tela de náilon, fixados com liga de borracha, e invertido no funil de Baermann parcialmente cheio de água, onde permaneceu por 24 h (Figura 3). Ao final desse período, coletaram-se 10 ml de suspensão, por funil, para avaliação.

(v) Filtro de Algodão de Oostenbrink, de acordo com s'JACOB e BEZOOIJEN (17): em um balde (I) colocou-se subamostra de solo (50g) e adicionaram-se 600 ml de água de torneira. Agitou-se a suspensão por 15 seg, deixando-se decantar por 10 seg. A suspensão foi vertida em outro balde (II), com cuidado, para que não passasse solo. A operação foi repetida com o solo do balde I, e a suspensão foi coletada, novamente, no balde II. Após 5 min de repouso, a suspensão do balde II foi vertida suavemente sobre uma camada de algodão, tendo uma peneira de náilon (17cm de diâmetro) como suporte. A peneira foi colocada em prato plástico com água de torneira, completando-se o volume com o auxílio de piseta, de modo que a camada de algodão ficasse em contato com a água. Transcorridas 24 h, removeu-se, cuidadosamente, a peneira com a camada de algodão e coletou-se a suspensão de nematóides em bêquer de 250 ml, que, após 12 h de repouso, teve seu volume reduzido, por sifonação, para 10 ml (Figura 4).

(vi) Flutuação Centrífuga, de acordo com JENKINS (13): 50 g de solo foram colocados em balde plástico (cinco litros de capacidade) e dois litros de água de torneira foram adicionados e misturados completamente. Após 20 seg de repouso, a suspensão foi passada numa peneira de 20 mesh, para um segundo balde e, em seguida, por uma peneira de 325 mesh. Os resíduos e nematóides retidos na peneira de 325 mesh foram coletados em tubos de centrífuga de 50 ml. Utilizando-se centrífuga de mesa, FANEM, com oito tubos de 50 ml, procedeu-se a duas centrifugações, a 1750 rpm (cerca de 450 g). A primeira por 5 min: descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sendimento com sacarose (açúcar comercial), na densidade de 1,13 (454 g de açúcar refinado/um litro de água). A segunda centrifugação durou 1 min: o sobrenadante foi vertido numa peneira de 325 mesh e os nematóides nela retidos foram coletados em bêquer, com jato de água de uma piseta (Figura 5).

Excetuando os métodos de flutuação centrífuga e decantação e peneiramento de Cobb, os demais foram executados em câmara com temperatura controlada ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$).

O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 6×3 , com seis repetições. Os fatores estudados foram seis métodos de extração e três texturas de solo, para cada um dos gêneros selecionados.

A avaliação foi realizada em microscópio estereoscópico, em placa de contagem comum.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise estatística, os dados foram transformados em raiz quadrada, visto que o teste de homogeneidade de variâncias de Bartlett demonstrou não-homogeneidade das variâncias dos dados originais.

A interação de textura do solo e método de extração não afetou, significativamente, a recuperação de nenhum dos quatro gêneros. A análise de variância reve-

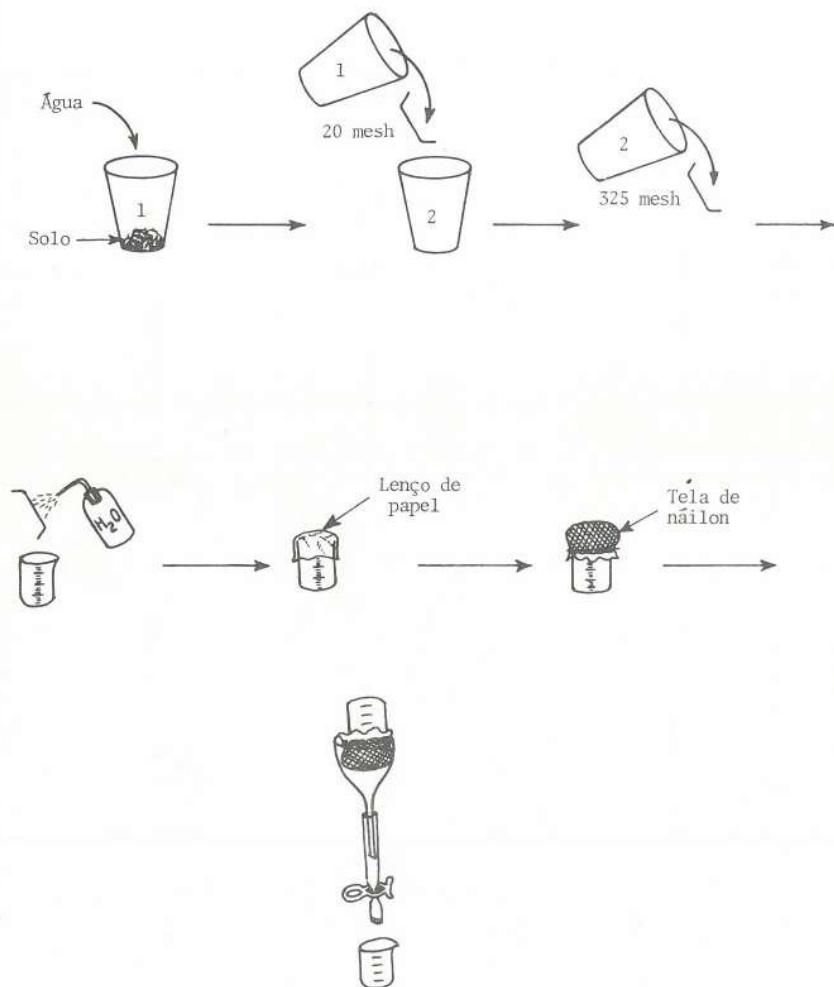


FIGURA 3 - Decantação e peneiramento de Cobb combinado com o funil de Baermann (segundo THORNE, 1961).

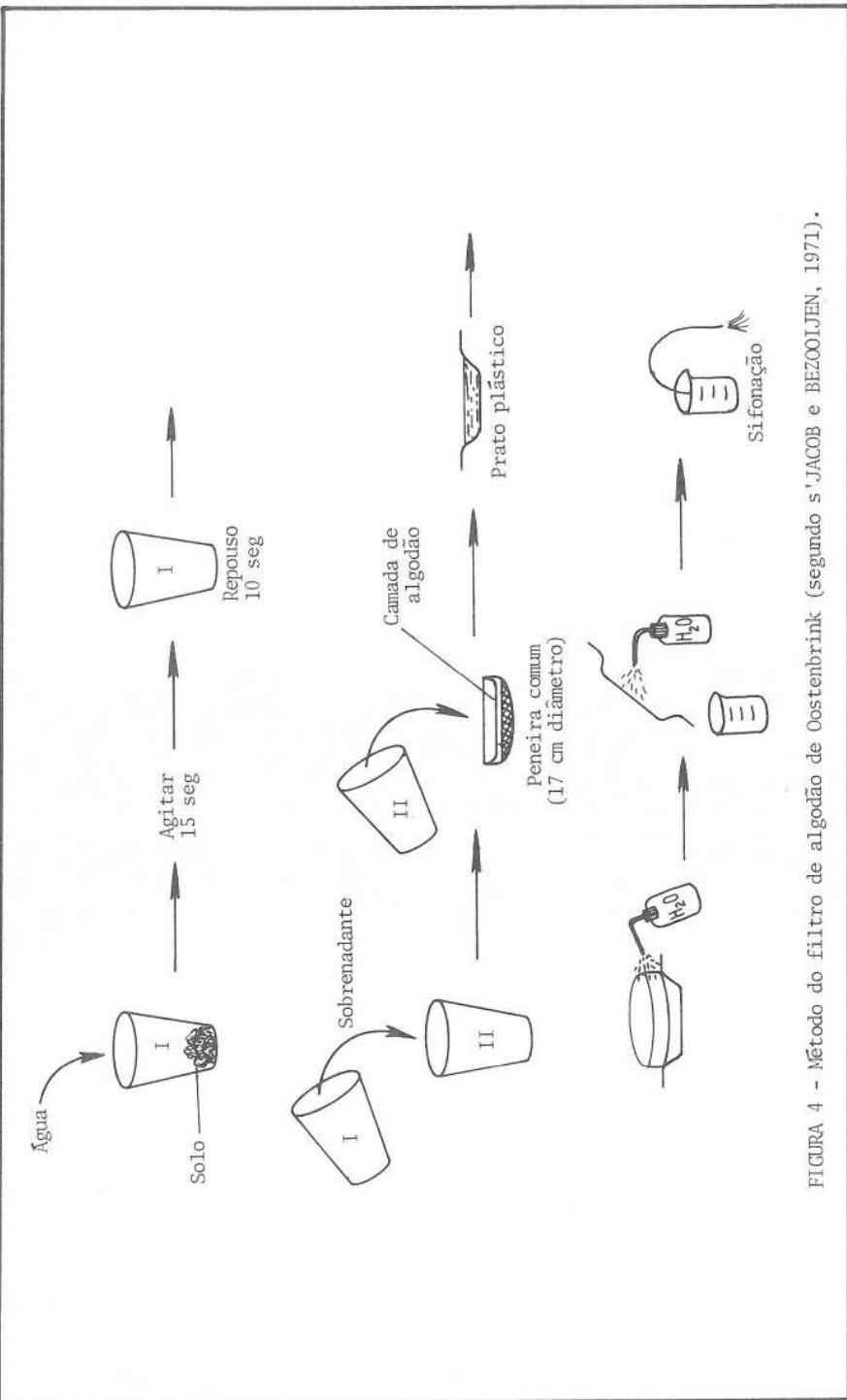


FIGURA 4 - Método do filtro de algodão de Oostenbrink (segundo s'JACOB e BEZOOIJEN, 1971).

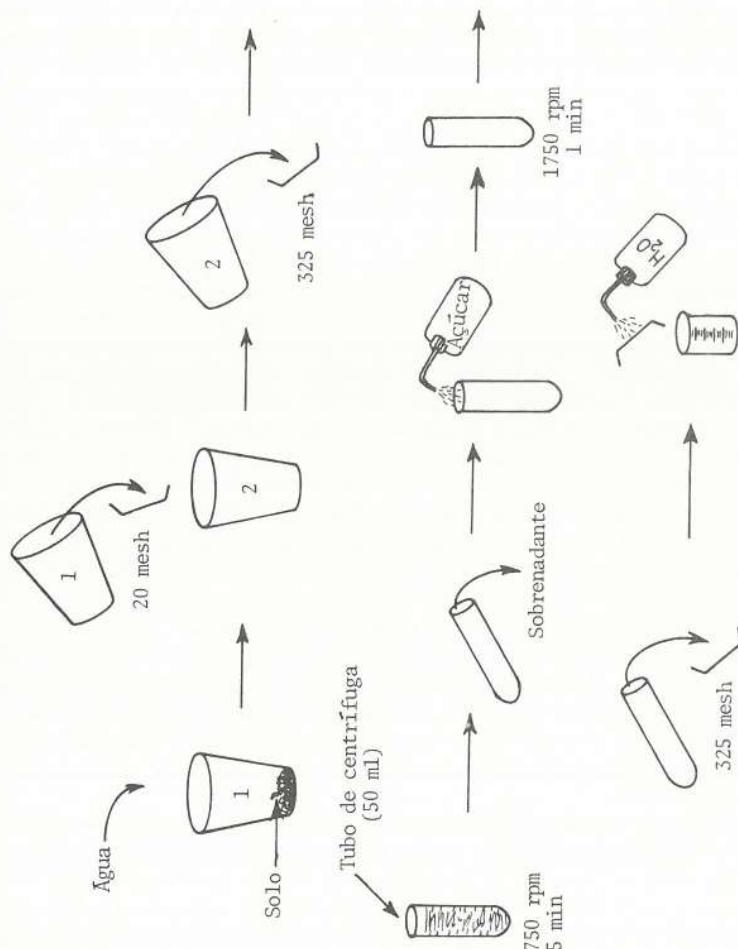


FIGURA 5 - Método de flutuação centrífuga (JENKINS, 1964).

lou diferença significativa entre os efeitos isolados de textura do solo sobre a extração de nematóides do gênero *Tylenchorhynchus* e larvas de *Meloidogyne javanica*. Recuperação máxima de *Tylenchorhynchus* sp. foi obtida do solo de textura franco-arenosa, que não diferiu estatisticamente da do solo de textura muito argilosa. Foi máxima a recuperação de *M. javanica* do solo da classe textural muito argilosa (Quadro 3).

O fato de a interação de textura do solo e método de extração não ter sido significante demonstra que os métodos apresentam resultados semelhantes, para cada gênero, quando usados em solos com diferentes texturas. Em razão disso, calculou-se a percentagem de nematóides recuperados pelas seis técnicas de extração, independentemente da textura do solo (Figura 6). Maior quantidade de espécimes de todos os gêneros foi recuperada pelos métodos de decantação e peneiramento de Cobb e flutuação centrífuga em solução de açúcar. Excetuando a técnica de decantação e peneiramento de Cobb, para o gênero *Tylenchorhynchus*, a eficiência de extração foi baixa, verificando-se menos de 50% de recuperação.

A forma assumida pelo nematóide é importante para a sua recuperação. Nematóides que assumem a forma espiralada podem ser perdidos mais facilmente que os que assumem a forma retilínea (19). Isso pode explicar a maior recuperação do nematóide espiralado *Helicotylenchus* sp. pela técnica de flutuação centrífuga, cuja eficiência independe da forma assumida pelo nematóide (Figura 6).

Verificou-se que os métodos que envolvem o princípio do funil de Baermann, ou seja, que dependem do movimento do nematóide e de sua habilidade em passar através de lenço de papel ou camada de algodão, são inadequados para a recuperação dos nematóides anelados, do gênero *Nothocriconema*. Entretanto, resultado surpreendente na extração desses nematóides foi obtido com o método do filtro de algodão de Oostenbrink, cuja eficiência foi praticamente igual à obtida com as técnicas de decantação e peneiramento de Cobb e flutuação centrífuga (Figura 6). Explicação satisfatória para isso não foi encontrada, já que a referida técnica depende das características do nematóide, e *Nothocriconema* sp., além de se movimentar lentamente, tem cutícula com anelações proeminentes, o que, normalmente, dificultaria sua passagem através da camada de algodão.

A técnica de decantação e peneiramento de Cobb foi superior às outras para *Tylenchorhynchus* sp. e larvas de *M. javanica* (Figura 6). Contudo, não é muito recomendável, por apresentar várias desvantagens: é trabalhosa, relativamente demorada, envolve o uso de uma série de peneiras de aberturas de malha diferentes e proporciona suspensão final muito suja, dificultando a avaliação, tanto qualitativa como quantitativa.

A recuperação de nematóides pelas seis técnicas testadas foi variável, para os quatro gêneros. Ficou demonstrado que nenhuma técnica é igualmente eficiente para todos os gêneros. Entretanto, a técnica de flutuação centrífuga mostrou versatilidade para extrair diferentes gêneros de nematóides. Alguns aspectos, como rapidez, facilidade de execução, uso de equipamentos básicos de laboratório e suspensão final clara, fazem com que seja a técnica preferida por muitos pesquisadores (2, 9, 12, 25).

4. RESUMO

Avaliou-se a eficiência de seis métodos de extração na recuperação de quatro gêneros de fitonematóides do solo. Para isso utilizaram-se subamostras de solo (50g) de três classes texturais (franco-arenosa, muito argilosa e argilo-arenosa), infestadas artificialmente com 500 ± 10 espécimes de *Tylenchorhynchus* sp., *Helico-*

QUADRO 3 - Influência da textura do solo na extração de diferentes fitonematóides. UFV, Viçosa, MG, 1986

Textura do solo	Número médio de espécimes extraídos/50g de solo ^{1/}			
	<i>Tylenchhorhynchus</i> (500 ± 10) ^{2/}	<i>Helicotylenchus</i> (500 ± 10)	<i>Nothocricinema</i> (500 ± 10)	<i>M. javanica</i> (250 ± 10)
Franco-arenoso	15,66 a	9,86 a	5,67 a	5,39 a
Muito argiloso	14,74 ab	9,96 a	6,93 a	7,16 b
Argilo-arenoso	13,58 b	9,81 a	5,95 a	5,33 a
C.V. (%)	21,04	41,07	96,74	41,00

1/ Dados transformados em \sqrt{x} , média de seis repetições. As médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

2/ Quantidade utilizada na infestação artificial de cada amostra de solo.

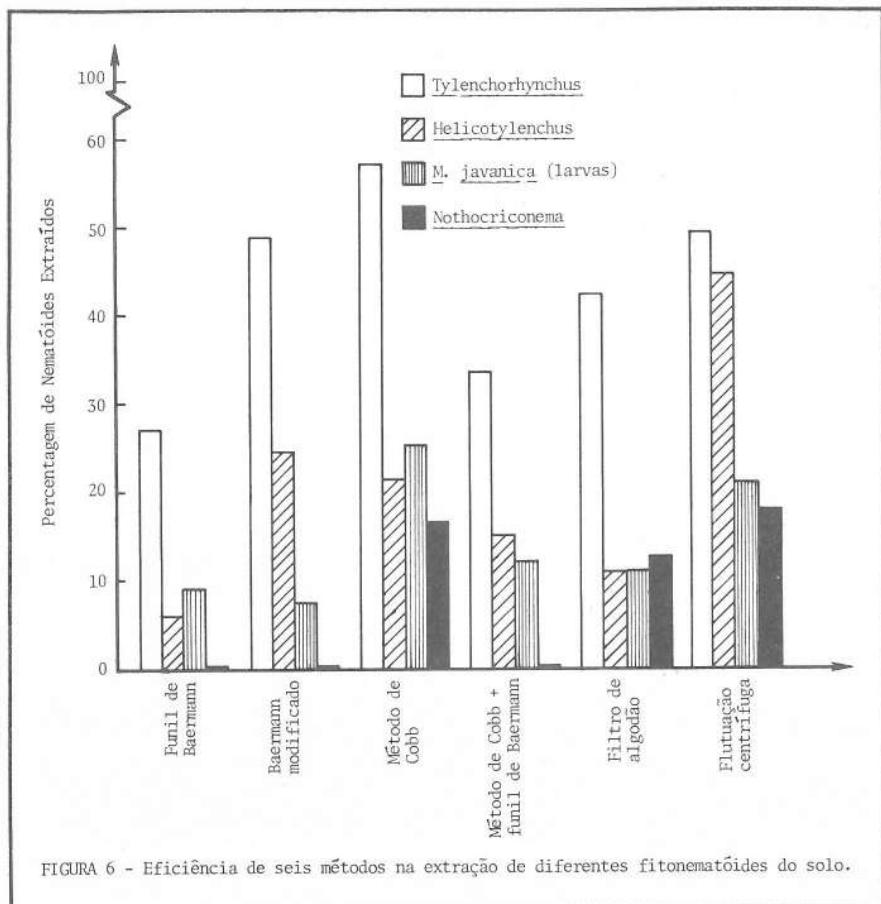


FIGURA 6 - Eficiência de seis métodos na extração de diferentes fitonematóides do solo.

tylenchus sp. e *Nothocriconema* sp. e 250 ± 10 larvas de segundo estádio de *Meioidogyne javanica*. A análise estatística não revelou efeito significativo da interação de textura do solo e método de extração. Detectou-se significância do efeito isolado de textura do solo apenas para *Tylenchorhynchus* sp. e *M. javanica*. Maior recuperação de nematóides do gênero *Tylenchorhynchus* foi obtida do solo de textura leve (franco-arenosa), enquanto larvas de *M. javanica* foram extraídas em maior quantidade do solo com textura muito argilosa. Excetuando a técnica de decantação e peneiramento de Cobb, para *Tylenchorhynchus* sp., nenhuma técnica proporcionou 50% de recuperação dos nematóides adicionados ao solo. Demonstrou-se que a técnica do funil de Baermann e as suas variantes são ineficientes na recuperação de *Nothocriconema* sp. Constituiu exceção o método do filtro de algodão de Oostenbrink, que proporcionou boa extração desse nematóide. O fato de os parâmetros textura do solo e método de extração não terem interagido significativamente indica que os métodos foram consistentes quando usados com diferentes tipos de solo. Apesar da não-significância do efeito isolado de método de extração, verificou-se que as técnicas que dependem menos das características dos nematóides (decantação e peneiramento de Cobb e flutuação centrífuga) foram superiores às demais. Entretanto, a técnica de flutuação centrífuga apresenta

algumas vantagens: facilidade e rapidez de execução, uso de equipamentos básicos de laboratório e suspensão final limpa.

5. SUMMARY

(COMPARISON OF SIX METHODS FOR EXTRACTION OF DIFFERENT GENERA OF PLANT PARASITIC NEMATODES FROM THREE SOIL TYPES)

A sandy soil (71% sand), a clay soil (28% sand) and a mixture of them (49% sand) were used to compare the efficiency of six methods of extraction on four genera of plant parasitic nematodes. Fifty grams of each soil sample were artificially infested with 500 ± 10 *Tylenchorhynchus* sp., *Helicotylenchus* sp. and *Nothocriconema* sp and 250 ± 10 second stage larvae of *Meloidogyne javanica*. Greater recovery of *Tylenchorhynchus* was verified in the sandy soil whereas *Meloidogyne* larvae were more efficiently extracted from clay soil, with all six methods. The recovery capacity of all methods was below 50%, except Cobb's decanting and sieving technique when used for *Tylenchorhynchus* sp. As expected, Baermann's funnel and their variants did not recover *Nothocriconema*; however Oostenbrink's cotton filter was an exception. In general, Cobb's method as well as centrifugal flotation recovered more nematodes than the other methods, the latter being more convenient to use due to a clearer nematode suspension at the end.

6. LITERATURA CITADA

1. ALLEN, O.N. *Experiments in soil bacteriology*. Minneapolis, Burgess, 1959. 117 p.
2. AYALA, A.; ROMÁN, J. & TARJAN, A.C. Comparison of four methods for isolating nematodes from soil samples. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 47(4):219-225. 1963.
3. AYOUB, S.M. *Plant nematology, an agricultural training aid*. Sacramento, State of California, Dept. of Food and Agric., 1977. 157 p.
4. BARKER, K.R.; BYRD, D.W. Jr.; GRIFFIN, W.E.; STONE, C.A. & NUSBAUM, C.J. A semi-automatic elutriator for extracting nematodes. *Journal of Nematology* 7(4):320. 1975.
5. BARKER, K.R.; NUSBAUM, C.J. & NELSON, L.A. Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic nematodes as measured by three extraction procedures. *Journal of Nematology* 1(3):232-239. 1969.
6. BYRD Jr., D.W.; BARKER, K.R.; FERRIS, H.; NUSBAUM, C.J.; GRIFFIN, W.E.; SMALL, R.H. & STONE, C.A. Two semi-automatic elutriators for extracting nematodes and certain fungi from soil. *Journal of Nematology* 8(3): 206-212. 1976.
7. BYRD Jr., D.W.; NUSBAUM, C.J. & BARKER, K.R. A rapid flotation-sieving technique for extracting nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 50(12): 954-957. 1966.

8. COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. Extraction de *Longidorus* et *Xiphinema* spp. du sol par centrifugation en utilisant du silice colloidal. *Nematologia Mediterranea* 5(2):195-206. 1977.
9. DICKERSON, O.J. An evaluation of the direct centrifugal-flotation method of recovering nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 61(12):1054-1057. 1977.
10. ESCOBAR, R. & VOLCY, C. Evaluación de métodos de extracción de nemátodos del suelos de textura fina. *Fitopatología Colombiana* 7(1):19-23. 1978.
11. FLEGG, J.J.M. & HOOPER, D.J. Extraction of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J.F. (ed.). *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. London, Min. Agric., Fish. and Food, Her Majesty's Stationery Office, 1970. p. 5-22. (Tech. Bull. no. 2).
12. HARRISON, J.M. & GREEN, C.D. Comparison of centrifugal and other methods for standardization of extraction of nematodes from soil. *Annual of Applied Biology* 82(2):299-308. 1976.
13. JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48(9):692. 1964.
14. MENDES, M.L.; FERRAZ, S. & REGAZZI, A.J. Efeito de temperatura, luz e intervalo de coleta na extração de nematóides do solo pelo método do funil de Baermann. *Revista Ceres* 35(197):1-16. 1988.
15. OOSTENBRINK, M. Comparison of techniques for population estimation of soil and plant nematodes. In: PHILLIPSON, J. (ed.). *Methods of Study in Soil Ecology*. Paris, UNESCO, 1970. p. 249-255.
16. RICKARD, D.A. & BARKER, K.R. Nematode assays and advisory services. In: RIGGS, R.D. (ed.). *Nematology in the Southeastern Region of the United States*. Fayetteville, Agric. Exp. Station Univ. Arkansas, 1982. p. 8-20. (Southern Coop. Series Bull. 276).
17. s'JACOB, J.J. & BEZOOLIJEN, J.V. A manual for practical work in nematology. Wageningen, s. ed., 1977. 65 p.
18. THORNE, G. *Principles of Nematology*. New York, McGraw-Hill, 1961. 533 p.
19. TOWNSHEND, J.L. An examination of the efficiency of the Cobb decanting and sieving method. *Nematologica* 8(2):293-300. 1962.
20. TRUDGILL, D.L.; EVANS, K. & FAULKNER, G. A fluidising column for extracting nematodes from soil. *Nematologica* 18(4):469-475. 1972.
21. TUPPEN, C. Extraction of *Longidorus* and *Xiphinema* from soil: a further modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Nematologica* 21(2): 263-264. 1975.
22. VIGLIERCHIO, D.R. & SCHMITT, R.V. On the methodology of nematode

- extraction from field samples: Baermann funnel modifications. *Journal of Nematology* 15(3):438-444. 1983.
23. VOLCY, C. Evaluación de métodos de extracción de nematodos en suelos de diferentes texturas. *Fitopatología Colombiana* 7(1):15-18. 1978.
24. WHITEHEAD, A.G. & HEMMING, J.R. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annual of Applied Biology* 55(1):25-38. 1965.
25. WILLARD, J.R. & PETROVICH, M.S. Efficiency of the centrifugal-flotation method for extraction of nematodes from clay soils. *Plant Disease Reporter* 59(4):314-318. 1975.
26. WILLARD, J.R. & PETROVICH, M.S. A direct centrifugal-flotation method for extraction of nematods from clay soils. *Plant Disease Reporter* 56(9): 808-810. 1972.