



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA- UNEB
Departamento de Ciências Humanas
Colegiado do Curso de Engenharia Agrônômica
campus IX- Barreiras

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
Departamento de Ciências Humanas – Campus IX

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE NEMATÓIDES PELO MÉTODO DE PENEIRAMENTO E FLUTUAÇÃO EM CENTRIFUGA COM SOLUÇÃO DE SACAROSE (Método de Jenkins 1964)

Luise Santos Ferreira

BARREIRAS-BA
2017

Luise Santos Ferreira

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE NEMATÓIDES PELO MÉTODO DE PENEIRAMENTO E FLUTUAÇÃO EM CENTRIFUGA COM SOLUÇÃO DE SACAROSE (Método de Jenkins 1964)

Monografia apresentada ao colegiado de Engenharia Agrônoma da Universidade do Estado da Bahia – UNEB- Campus IX, como requisito parcial para avaliação do trabalho de conclusão do curso de Engenharia Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. João Luíz Coimbra

BARREIRAS-BA

2017



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS HUMANAS-CAMPUS IX
COLEGIADO DO CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

LUISE SANTOS FERREIRA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE
NEMATÓIDES PELO MÉTODO DE PENEIRAMENTO E FLUTUAÇÃO EM
CENTRIFUGA COM SOLUÇÃO DE SACAROSE (Método de Jenkins 1964)**

Monografia apresentada ao Colegiado de Engenharia Agrônômica da Universidade do Estado da Bahia – UNEB - *Campus IX*, como requisito parcial para avaliação do Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia Agrônômica.

Barreiras – BA, julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Luiz Coimbra UNEB - BA

Orientador

Prof. Dr. Tadeu Cavalcante Reis UNEB - BA

Coorientador

Me. Heliab Bomfim Nunes UNEB - BA

Convidado

Aprovado em ___/___/2017.

Primeiramente a DEUS por está presente em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe Simira Santos da Silva, a minha irmã Luara Santos pelo amor, carinho, compreensão e motivação que elas me deram para que eu conseguisse concluir esse trabalho.

Aos meus avós Domigos Ferreira (in memoria) e Naura Ferreira por todo amor e ensinamentos transmitidos e pela compreensão quando não pude estar presente.

Ao meu amigo João Neto Rodrigues pela motivação e amizade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela saúde e força para que conseguisse realizar esse projeto.

Á minha Mãe Simira pelo amor, dedicação, incentivo e compreensão por todos os momentos que tive ausente para realização desse projeto e por ser minha fonte de força e determinação.

Á minha irmã Luara por todo incentivo durante a minha jornada acadêmica.

As minhas amigas Fabiana Trabuco, Marquele Paula, Daniela Correia e Hérika Lima por todo apoio para realização desse projeto e por todos os momentos de alegrias e angustias que compartilhamos durante nossa jornada acadêmica.

Aos demais amigos e familiares que contribuíram indiretamente para realização dessa pesquisa, que me apoiaram e me motivaram sempre.

Aos colegas de laboratório Iara Gonçalves, Rafael Soares e Amanda Pacheco pelo apoio e auxílio durante o desenvolvimento desse projeto.

Ao Prof Dr João Luiz Coimbra pelos ensinamentos, apoio, paciência e confiança para realização desse trabalho.

Ao Prof Dr Tadeu Cavalcante Reis pelas orientações dadas durante a realização dessa pesquisa.

Ao Me Heliab Bomfim Nunes pela sua disposição e apoio na fase final desse projeto.

Ao Prof D. Sc Marcos Wanderlei Silva pelos ensinamentos e correção do meu trabalho.

Ao Técnico José Antônio que deu apoio durante a realização das atividades em casa de vegetação.

BIOGRAFIA

LUISE SANTOS FERREIRA- filha de Luiz Rogerio Ferreira de Souza e Simira Santos da Silva nasceu em Ibipeba-Ba em 08 de junho 1995. Ingressou na Universidade no curso de bacharelado em Engenharia Agrônômica na universidade do Estado da Bahia UNEB/ *Campus IX*, Barreiras em Abril de 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Nematoides.....	14
2.2 Análise Nematológica	15
2.3 Princípios de Extração de Nematoides.....	16
2.4 Métodos de extração	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÃO	23
6 REFERENCIAS.....	24
7 APÊNDICE	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Plantas de tomate utilizadas na multiplicação de nematóides *Meloidogyne*19**
- Figura 2: Peneira de 500 mesh onde fica retido o material contendo nematóides que posteriormente é recuperado e colocado em centrifuga.....19**
- Figura 3: Lamina usada para contagens dos nematóides19**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: População de nematóides em estágio J2 quantificados em cada tratamento e testemunha.20

Tabela 2: População de nematóides encontrados em amostras que foram avaliadas pela interação dos fatores solo e água.21

FERREIRA, Luise Santos. **Padronização de metodologia para extração de nematóides pelo método de peneiramento e flutuação em centrífuga com solução de sacarose (método de Jenkins 1964)**. 2017, 27p. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônômica)- Universidade do Estado da Bahia. Barreiras, BA, 2017.

RESUMO

O diagnóstico de nematóides é feito em laboratório nematológico, com amostras de solo e raízes. Em laboratório as amostras passam pelo processo de extração que são desenvolvidas por métodos específicos para cada tipo de amostra, para amostras de solo o método usado é o de peneiramento e flutuação em centrífuga com solução de sacarose método de Jenkins1964. A partir da extração os nematoides são identificados e as espécies presentes na área são quantificadas, essas são informações indispensáveis para dar início a escolhas de qual melhor método de controle para a atual situação do campo. O trabalho teve como objetivo padronizar a metodologia usada no Método de Jenkins (1964) ou método do peneiramento e flutuação em centrífuga. Para estudar a melhor metodologia para extração os experimentos foram desenvolvidos em fatorial 2x3 sendo os fatores quantidades de solo (100 cc e 200cc) e volume de água (0,6L, 1L e 2L). Amostras de solo foram colocadas em balde plástico juntamente com a água e com as mãos o solo foi misturado com água e vertido em peneiras de 60, 200 e 500 mesh o material retido na peneira de 500 mesh é recuperado e colocados para centrifugar por 5 minutos a uma rotação de 1800 giros, após esse tempo o sobrenadante é descartado e adicionado solução de sacarose com densidade de 1,15 que é centrifugado por 1min e o sobrenadante e vertido em peneira de 500 mesh onde são recuperados os nematoides extraídos que são visualizados em microscópio. A interação dos fatores quantidade de solo e volume de água apresentou diferença significativa entre todos os tratamentos compostos por 100 cc de solo e 0,6L, 1L e 2L. Para os tratamentos de 200 cc de solo e 0,6L e 1L de água não houve diferenças já para o tratamento de 2L de água apresentou diferença significativa quando comparado com os demais tratamentos. A extração Nematologica realizada com amostras de solo de 100 cc de solo e volume de 0,6 L de água apresentou-se melhor metodologia na quantificação de nematoides juvenis de segundo estagio.

PALAVRAS-CHAVE: extração nematologica, solo, Meloidogyne.

FERREIRA, Luise Santos. Standardization of methodology for nematode extraction by sieving and centrifugal flotation with sucrose solution (Jenkins method 1964). 2017, 27p Monography (Graduation in Agronomic Engineering) - State University of Bahia. Barreiras, BA, 2017.

ABSTRACT

The diagnosis of nematodes is done in a nematological laboratory, with soil samples and roots. In the laboratory the samples go through the extraction process that are developed by specific methods for each type of sample, for soil samples the method used is the screening and flotation in centrifugal with sucrose solution method of Jenkins 1964. From the extraction the nematodes are identified and the species present in the area are quantified, these are indispensable information to initiate the choices of which better method of control for the current situation of the field. The objective of this study was to standardize the methodology used in the Jenkins Method (1964) or centrifuge screening and flotation method. In order to study the best methodology for extraction, the experiments were developed in factorial 2x3, with the factors being soil (100 cc and 200cc) and water volume (0.6L, 1L and 2L). Soil samples were placed in plastic bucket along with water and with hands the soil was mixed with water and poured into 60, 200 and 500 mesh sieves the material retained in the 500 mesh sieve is recovered and placed to centrifuge for 5 minutes At a rotation of 1800 turns, after that time the supernatant is discarded and sucrose solution with density of 1.15 is centrifuged for 1mM and the supernatant is poured into 500 mesh sieve where the extracted nematodes are recovered which are visualized in microscope. The interaction of the soil and water volume factors showed a significant difference between all treatments composed of 100 cc of soil and 0,6L, 1L and 2L. For the treatments of 200 cc of soil and 0,6L and 1L of water there were no differences already for the treatment of 2L of water presented a significant difference when compared with the other treatments. Nematological extraction with soil samples of 100 cc of soil and volume of 0.6 L of water presented a better methodology in the quantification of second stage juvenile nematodes.

KEY WORDS: nematological extraction, soil, Meloidogyne.

1 INTRODUÇÃO

Fitonematóides são nematóides parasitos de plantas, que em geral parasitam as raízes provocando alterações fisiológicas e injúrias comprometendo o desenvolvimento e produtividade da cultura (CORDEIRO e SANTOS, 2010). Nematoides tem ocorrência em todo território nacional e ampla diversidade de culturas que são atacadas, a depender do grau de susceptibilidade pode causar danos severos as plantas e grandes prejuízos econômicos ao produtor. Na região oeste da Bahia muitas culturas anuais estão sendo seriamente prejudicadas inclusive no sistema integração lavoura pecuárias (ILP) e plantio direto (PD) (GOULART, 2008). O controle de nematóides é muito difícil por esses ter uma alta capacidade de sobrevivência no solo, e diversidade em plantas hospedeiras favorecendo o desenvolvimento de seu ciclo e conseqüentemente sua multiplicação.

O diagnóstico de nematóides é feito em laboratório nematológico, com amostras de solo e raízes, análise nematologica deve expressar de maneira mais homogênea e real a situação do campo em relação aos nematoides presentes na área. Em laboratório as amostras passam pela extração que são desenvolvidas por métodos específicos para cada tipo de amostra, para amostras de solo o método usado é o de peneiramento e flutuação em centrifuga com solução de sacarose (JENKINS1964) esse método é o mais usado, para amostras de material vegetal é usado o método do liquidificador, peneiramento e flutuação em centrifuga (COOLEN E D'HERDE 1972).

O método de Jenkins (1964) é o método mais usado em laboratórios de nematologia, por ser um método simples, e não exigir padronização, esse método é muito flexível a modificações que podem ser desenvolvidas de acordo com o profissional que está realizando essa atividade, as modificações mais comuns é o procedimento de coleta de solo, quantidade de água e forma de dispersão do solo.

Extração nematologica é desenvolvida por métodos que podem ser quantitativos ou qualitativos, podem extrair nematoides migratórios ou sedentários, nas formas ativas ou inativas MANSO e TENENTE (1994). A partir da extração os nematoides são identificados e as espécies presentes na área são quantificadas, essas são informações indispensáveis para dar inicio a escolhas de qual melhor método de controle para a atual

situação do campo, não é possível fazer diagnósticos de doenças causadas por nematoides com base apenas em observações visuais do campo (GOULART, 2009).

Os danos causados pelo ataque de nematoides são severos e de acordo com o grau de infestação na área de cultivo pode causar perdas totais, nematoides do gênero *meloidogyne* formador de galhas nas raízes, é a espécie de nematoide que tem relatos de ocorrência em todas as regiões do país e atacam culturas de grande valor econômico.

Na Região Oeste da Bahia a utilização de áreas nativas de cerrado para cultivo de culturas de interesse econômico é uma atividade relativamente recente por se tratar de uma região que possuem solos com baixíssima fertilidade, nos solos de áreas nativas possuem fauna muito diversificada desde nematoides de vida livre á fitonematóides que vivem em equilíbrio, com a implantação do cultivo de monocultura nesses solos propiciou o desenvolvimento de nematoides que atuam como pragas e causam sérios danos na produtividade e economia.

A diagnose de nematoides se fez o principal mecanismo para elaborar estratégias para controle dessa praga que pode causar perdas e danos irreversíveis. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo padronizar a metodologia usada no Método de Jenkins (1964) ou método do peneiramento e flutuação em centrífuga.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematoides

Os nematoides são vermes com o formato do corpo cilíndricos, embora variável, referida comumente como filiforme, ou seja, em forma de fio (aliás, o nome deriva do grego *nema*, que significa fio) as fêmeas na fase adulta tem formato parecido a um saco. São animais aquáticos, que podem ser encontrados nos oceanos e mares, nas coleções de água doce e no filme ou película de água existente entre as partículas de solo (BROWN e FERRAZ, 2016).

Nematoides são classificados de acordo aos seus hábitos alimentares, que constituem três grupos: com hábitos de vida livre; os zooparasitas ou parasitas de animais; e os fitoparasitas ou parasitas de plantas (fitonematoides). Nematoides de vida livre constituem um grupo heterogêneo que não são visíveis ao olho nu embora tenha comprimentos de 0,2 a 1,5mm, esses se alimentam de protozoários, algas, fungos e bactérias diferentes dos fitonematoides, esses podem ter influência benéfica na fertilidade do solo e produtividade de cultura (MOREIRA, 2007).

Os fitonematoides são pragas importantes na maioria das culturas de interesse econômico e responsáveis por perdas de produção significativas, além de gerar altos custos para o seu controle, o alvo de ataque são as raízes e órgãos subterrâneos, os fitonematoides atacam uma grande variedade de espécies e de culturas (GALBIERE *et al* 2016).

A principal característica morfológica dos fitonematoides é a presença de um estilete bucal típico. É um órgão canaliculado, que se presta tanto à injeção de substâncias tóxicas produzidas pelo nematoide, como à ingestão de alimento líquido disponibilizado pela célula vegetal parasitada (FERRAZ, 2011).

De acordo FERRAZ (2012) os sintomas costumam ser divididos em dois tipos: DIRETOS: são os observados no órgão vegetal que está sendo atacado, ou seja, onde os nematoides estão vivendo e desenvolvendo sua ação parasitária. Como o ataque dos nematoides, na grande maioria dos casos, são nas raízes, os sintomas diretos corresponde aos sintomas “provocados nas raízes”; e REFLEXOS: são aqueles apresentados em outras partes das plantas, ou seja, principalmente nos órgãos aéreos (caule, folhas, ramos, flores, frutos). São assim chamados porque no geral refletem

alterações ou desarranjos observados na parte aérea das plantas que são meramente decorrentes de danos causados às raízes.

2.2 Análise Nematológica

Análise nematológica deve expressar de maneira confiável e segura a real situação dos nematoides no campo, distribuição espacial, temporal, disposição dos organismos no campo, disponibilidade de nutrientes, habitat apropriado para sobrevivência e reprodução, interação com organismos da mesma espécie, essas condições devem ser observadas e consideradas na amostragem da área (GOULART, 2010).

Populações de nematoides são compostas de indivíduos móveis, ligeiramente móveis ou inativos (cistos, ovos individuais ou em massas), ou de combinação destes. Os métodos de extração usam combinação de vários princípios, nenhum método possui máxima eficácia, algumas metodologias são para extração no solo e outras para tecido vegetal (MANSO e TENENTE, 1994).

Análise nematológica é uma atividade desenvolvida em laboratórios de nematologia nos quais usam métodos que são baseados em princípios de acordo com o material da amostra que podem ser solo ou tecidos vegetais principalmente as raízes, o método mais usado para extração de nematoides no solo é o "Método de Jenkins" (1964), "método do peneiramento e flutuação em centrífuga". Tal técnica combina princípios em fases de peneiramento e centrifugação, permitindo a separação dos nematoides presentes na amostra da matéria orgânica e das frações arenosa e argilosa do solo (FERRAZ, *et al* 2012).

GOULART (2010) a separação dos nematoides presentes na amostra de solo ou material vegetal é de fundamental importância à análise nematológica é a partir dessa separação que é feita visualização, contagem e identificação. A suspensão obtida na separação dos nematoides do material extraído não tem pureza de 100%, mesmo com a separação ainda ficam partículas de solo, matéria orgânica, tecido vegetal dessa forma a análise nematológica visa aplicar os métodos de extração que possibilite a obtenção de uma suspensão de nematoides o mais pura possível.

2.3 Princípios de Extração de Nematoides

Os métodos de extração de nematoides usam a combinação de vários princípios, (flutuação, sedimentação, maceração, floculação, mobilidade e migração) a combinação de princípios depende das características do nematoide e tipo de substrato em que ele se encontra, alguns princípios são ideais para extração em solo e outros para extração em tecidos vegetais da planta raízes, órgãos subterrâneos, folhas (MANSO e TENENTE, 1994).

Para isolar nematoides do substrato hospedeiro esse deve ser submergido em água, a sua densidade quando separado do hospedeiro é superior a densidade da água, os nematoides quando retirados do seu hospedeiro as partículas desse depositam-se mais rapidamente e o nematoide por ser mais leve que as demais partículas do solo ficam mais sujeito a ação da gravidade SEDIMENTAÇÃO, de modo que o os nematoides permaneçam por mais tempo em suspensão, caracterizando FLUTUAÇÃO que tem eficiência para os grupos de nematoides de tamanho pequeno, e pode ser aplicado para formas ativas e não ativas, esse não tem influencia da mobilidade (BEZOOIJEN, 2006).

A flutuação deve ser feita usando solução de sacarose, magnésio ou zinco que são mais densas que água e o nematoide ficam em suspensão por mais tempo, e ajudam na recuperação de nematoides principalmente os de tamanhos grandes. O contato entre os nematoides e essas substâncias deve ser o mais rápido possível para evitar que ocorra deformação nas estruturas ou até mesmo a morte dos nematoides (MANSO e TENENTE, 1994).

MACERAÇÃO é um principio usado para extração de nematoides e espécimes, em tecidos vegetais, que consiste em reduzir o hospedeiro a pequenas partículas para que nematoides juvenis de terceiro (J3) e quarto (J4) estádios e fêmeas adultas endoparasitas sedentárias sejam extraídos, e o fator de reprodução é mais preciso (CHARCHAR *et al* 2006). FLOCULAÇÃO é uma técnica que se baseia na utilização de agentes floculantes que acelera a separação do nematoide de partículas do hospedeiro que pode ser solo ou raiz, os agentes floculantes aumentam o peso das partículas do hospedeiro de forma que decantem mais rápido e os nematoides fiquem

em suspensão, é uma técnica rápida e extrai diferentes tipos de nematoides (MANSO e TENENTE, 1994).

Os princípios de extração de fundamenta-se em características dos nematoides, quando em meio favorável (aquático) nematoides tem movimentação ativa, o que possibilita que esses migrem do substrato para o meio, a gravidade específica dos nematoides garante que esse fique em suspensão na água devido a densidade de seu corpo ser maior que a água quando em meio aquático migra do substrato para o meio e se mantém em suspensão.

2.4 Métodos de extração

A extração dos nematoides do solo é feita por um método chamado, de "Método de Jenkins" (ou "método do peneiramento e flutuação em centrífuga"). Tal técnica combina fases de peneiramento e centrifugação, permitindo a separação dos nematoides presentes na amostra da matéria orgânica e das frações arenosa e argilosa do solo (FERRAZ, 2011).

O PENEIRAMENTO é um método de extração de nematoides simples, esse método é combinado com o método de centrifugação, o peneiramento leva em consideração o tipo de solo para escolha das peneiras granulométricas. De número 20 e depois pela de 400 mesh, que é indicado para solos argilosos. Na peneira 20, de malha mais larga, apenas ficam retidos resíduos grosseiros, como pedrinhas, sementes, restos de folhas etc.. A peneira 400, com malha muito mais estreita, vai reter a matéria orgânica, os nematoides outros organismos microscópicos (FERRAZ, 2012).

CENTRIFUGAÇÃO usada para extração de nematoides com pouca mobilidade, a centrifugação é feita com soluções mais densas para que os nematoides fiquem em suspensão, também usados para clarificar amostras obtidas no peneiramento ou na elutriação. ELUTRIAÇÃO os nematoides e as partículas mais leves do solo são mantidos em flutuação através de um fluxo constante de água ao longo de uma coluna de vidro ou de metal (MANSO e TENENTE, 1994). Os resultados obtidos na análise nematológica é o primeiro guia para elaboração do manejo de nematoides dessa forma a extração deve ser realizada de forma que os métodos expresse sua máxima eficiência de extração, um erro cometido na extração de nematoides pode refletir em grandes prejuízos na produtividade de culturas de alto valor econômico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação e no laboratório de nematologia nas dependências da Universidade do Estado da Bahia – UNEB campus IX, em Barreiras – BA. O inoculo de *Meloidogyne* spp foi obtido a partir da rizosfera de plantas de soja *Glycine max* obtidas na fazenda modelo localizada no município de Barreiras- BA.

Em casa de vegetação foi cultivadas plantas de tomate *solanum lycopersicum* cultivar santa cruz, mudas de tomate foram produzidas em bandejas de isopor após 20 dias foram transplantadas para os vasos plásticos com capacidade para 3 kg, contendo substrato padronizado solo, esterco, areia na proporção 1:1:1 o solo foi devidamente esterilizado em autoclave. Sete dias após o transplante das mudas o solo foi infestado com 2.000 ovos de *Meloidogyne spp*, os vasos foram distribuídos ao acaso e a irrigação feita diariamente no período da manhã por 120 dias (Figura 1).

Amostras de solo foram coletadas 120 dias após a infestação para extração de nematoides pelo método de Jenkins (1964) ou método de peneiramento e flutuação em centrífuga com solução de sacarose a metodologia usada é descrita por FERRAZ (2012). As amostras de solo com 100 cm^3 e 200 cm^3 foram colocadas em balde e adicionado volume de 600 ml, 1L e 2L de água, o solo foi disperso com água e essa suspensão decantada por 30 segundos as partículas de solo acumularam no fundo do balde, o sobrenadante é vertido em peneiras sobreposta de 60, 200 e 500 mesh. O material retido na peneira de 500 (Figura 2) foi colocado em tubos de centrífuga que funcionou á 1800 giros durante cinco minutos, a centrífuga foi desligada e o sobrenadante descartado e adicionado solução de sacarose com densidade de 1,15 e ficou na centrífuga por 1 minuto á 1800 giros, o sobrenadante é vertido em peneira de 500 o material retido na peneira foi recuperado com água destilada e em caixa plástica transparente (Figura 3) o material é levado microscópio e a população de nematoides é contada material (Figura 4).

O experimento terá seus tratamentos distribuídos ao acaso em esquema fatorial de 2x3 com 6 tratamentos e 3 repetições, sendo 2 quantidades de solo (100 cm^3 e 200 cm^3) e 3 volumes de água (0,6 L, 1L e 2L) e testemunha (100 cm^3 e 0,8L).



Figura 1: Plantas de tomate utilizadas na multiplicação de nematóides *Meloidogyne*



Figura 2: Peneira de 500 mesh onde fica retido o material contendo nematóides que posteriormente é recuperado e colocado em centrifuga.

As avaliações foram feitas a partir da contagem do número de nematoides de segundo estágio J2 que compunha a população de nematóides presentes nas amostras, à extração foi feita pelo método de Jenkins (1964).



Figura 3: Lamina usada para contagens dos nematóides

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de extração de nematoides que possibilitou extrair maior quantidade de nematoides juvenis de segundo estágio foi à metodologia que usou menores quantidades de solo e água (100 cc de solo e 0,6L de água). Os tratamentos 2 e 4 não apresentaram diferenças estatísticas significativa quando comparados com a testemunha, já os tratamentos 1, 3, 5 e 6 foram estatisticamente diferentes da testemunha e dos tratamentos 2 e 4 (Tabela 1).

Tabela 1: População de nematoides em estágio J2 quantificados em cada tratamento e testemunha.

	N° de Nematóides
TESTEMUNHA (100 cc de solo/0,8L de Água)	58 a
TRATAMENTO 1(100 cc de solo /0,6 L de Água)	80 B
TRATAMENTO 2 (100 cc de solo/1 L de Água)	53 a
TRATAMENTO 3 (100 cc de solo/2L de Água)	69 B
TRATAMENTO 4 (200 cc de solo/0,6L de Água)	61 a
TRATAMENTO 5 (200 cc de solo/1L de Água)	11 B
TRATAMENTO 6 (200 cc de solo/2 L de Água)	35 B

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

A interação dos fatores quantidade de solo e volume de água apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos compostos por 100 cc de solo e 0,6L de água, 100 cc de solo e 1L de água e 100 cc de solo e 2L de água. Para os tratamentos formados de 200 cc de solo e 0,6L de água e 1L de água não houve diferenças, já para o tratamento feito com o volume 2L de água houve diferença significativa quando comparado com os demais tratamentos. As populações de nematoides juvenis de segundo de segundo estagio encontradas nos tratamentos compostos por 2L de água foram inferior aos demais tratamentos que foram desenvolvidos em mesmas condições de campo e laboratório (Tabela 2).

Essa diferença nos níveis populacionais de cada tratamento pode ter sofrido influencias endógenas (umidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio) ou exógenas (diapausa período de dormência devido a fatores endógenos não esta favorável para que ocorra a eclosão do ovo), nematoides podem estar em quiêscencia ou diapausa mesmo com presença de hospedeiro, dessa forma a eclosão dos juvenis é

influenciada pela umidade, temperatura, disponibilidade de oxigênio que devem estar ótimas para sua movimentação e parasitismo.

Tabela 2: População de nematóides encontrados em amostras que foram avaliadas pela interação dos fatores solo e água.

VOLUME DE SOLO		
Volume de Água	N° de Nematóides em 100 cm ³	N° de Nematóides em 200 cm ³
0,6 L	80 aA	53 aB
1 L	69 bA	61 aB
2 L	11 cB	35 bA
CV%	8,14	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,5$).

Os tratamentos que tiveram menores quantidades de água apresentaram maiores números de nematoides extraídos, corroborando com Asmus (2004) que usou o método de Jenkins (1964) na quais foram encontradas populações de nematoides *Meloidogyne* juvenis de segundo estágio variando de 10 á 1790 nematoides por amostra. As populações de nematoides encontradas nesse trabalho estão dentro do nível populacional encontrado por Asmus.

Quando Lordello e Fazuoli (2001) avaliaram o numero de nematoides *Meloidogyne* juvenis de segundo estagio presentes em amostras de solo, as populações encontradas variaram de 0 á 752 nematoides por amostras de solo, o volume de solo usado na metodologia usada por Lordello foi de 150 cc de solo.

Neves (2010) avaliou a população de *Meloidogyne* juvenil de segundo estagio em amostras de 100 cc de solo e encontrou populações composta de 0 á 273 nematóides por amostra, essas populações de nematóides descrita por Neves (2010) em amostra de 100 cc de solo reforça a eficiência de extração feita com amostras de 100 cc de solo demonstrada nessa pesquisa.

A oscilação do numero populacional de nematoides encontrados nos trabalhos citados pode está associada com características físicas do solo onde foram coletadas as amostras. Solos que apresentam uma textura argilosa é um solo mais compacto que possui microporosidade alta, é um solo pesado que não favorece o desenvolvimento de nematoides pois compromete a sua movimentação para chegar até o hospedeiro.

Os trabalhos citados as coletas de solo foram realizadas em áreas de cultivo que não se sabe qual grau de susceptibilidade ao ataque de nematoides a cultura apresenta. Nematoides são organismos que vive no solo, mas seu desenvolvimento e multiplicação depende que as condições ambientais estejam propícias, a duração do ciclo de vida de nematoides e entre duas e quatro semanas a depender das condições ambientais, em campo essas condições podem sofrer muitas variações ao longo do tempo o que interfere no desenvolvimento populacional dos nematoides.

Observando-se os resultados dos trabalhos citados que foram realizados com solo coletados á campo, em que cada propriedade tem suas condições de solo diferentes que podem favorecer ou inibir o desenvolvimento populacional de nematoides do gênero *Meloidogyne*. Os resultados obtidos nessa pesquisa indicam que a extração pelo método de Jenkins (1964) é eficiente e que a padronização da metodologia usada para extração, aponta para emissão de laudos de análises nematológicas, com resultados que expressem de forma mais real, o nível populacional de nematoides presentes nas áreas amostradas.

A metodologia desenvolvida é economicamente viável de modo que, a metodologia que apresentou a extração de maior número de nematoides foi a que usou menor volume de solo 100cc e menor volume de água 0,6L. A padronização da metodologia de extração pelo Método de Jenkis (1964) mostra-se promissora para emissão de laudos e como uma ferramenta para o planejamento de estratégias de manejo de nematoides.

5 CONCLUSÃO

A metodologia de extração Nematologica realizada com amostras de solo de 100 cc de solo e volume de 0,6 L de água extraiu mais nematoides *Meloidogyne*. juvenis de segundo estagio J2.

6 REFERENCIAS

ASMUS, G.L. **Ocorrência de nematoides fitoparasitos em algodoeiro no estado do Mato Grosso do Sul.** *Nematologia Brasileira*. vol.28, 77-86.2004. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/o1%20281/77-86%20pb.pdf> Acesso em: 19 de junho de 2017.

BROWN, D.J.F; FERRAZ, L .C. C.B; **Nematologia de Plantas: Fundamentos e Importância.** *Nematologia Brasileira*, Manaus, Norma editora, p 1-268,2016. Disponível em:< <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/ferbro/FerrazBrown2016v02.pdf>> Acesso em:20.jan.2017.

CHACHAR, J. M.; OLIVEIRA, V.R.; ARAGÃO, F.A.S. **Extração dos espécimens de *Meloidogyne* das raízes de tomateiro pela técnica do liquidificador**, Brasília, p.1-6, nov.2006. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/o1%20303/245-250%20pb.pdf>> Acesso em:08.mar.2017.

CORDEIRO, F.C; SANTOS, J.M. **prejuízos causados por nematóides dos gêneros *meloidogyne* e *Pratylenchus* na cultura de cana-de-açúcar**, Jaboticabal, v.1,p.1, 2010. Disponível em : <<http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/viewFile/145/pdf>> Acesso em:11.mar.2017.

FERRAZ, L. C. C. B. **Nematoides Fitoparasitos.** *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.19, n. 1, p.1-2, 2012. Disponível em:<<http://nematologia.com.br/wpcontent/uploads/2012/08/coleextra.pdf>> Acesso em:10.fev.2017.

GALBIERE, R, et al. **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**, n.3, p.1-340,mai. 2016 .Disponível em:< <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nemalگو/buknemalگو.pdf>> Acesso em:20.jan.2017.

GOULART, A.M. C **Análise nematológica: importância e princípios gerais.** Embrapa cerrado, planaltina-DF, p1-45,2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/899866/1/doc299.pdf>> Acesso em: 20.jan.2017.

GOULART, A.M.C. **Aspectos gerais sobre nematóides da lesões radiculares (gênero *pratylenchus*).** Embrapa cerrado, planaltina DF, p1-47,2008.Disponível em:<

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/571924/1/doc219.pdf>> Acesso em 18.jan.2017.

LORDELLO,A.I.L; LORDELLO,R.R.A; FAZOULI,L.C. **Levantamento de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no estado de São Paulo.**2001. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/o1%20281/77-86%20pb.pdf>. Acesso em: 19 de junho de 2017.

MANSO, E.C; TENENTE, R.V. **Extração e identificação de fitonematóides.** Embrapa cenargen, Brasília-DF, vol. 2 p 1-27, 1994. Disponível em:< <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/rapp/rapp05.pdf>> Acesso em:20.jan.2017.

MOREIRA F.J.C. **Hospedabilidade de plantas ornamentais e medicinais a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood (1949) e controle alternativo com óleos essenciais,** Fortaleza, p.19-36,set.2007. Disponível em:< http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/8482/1/2007_dis_fjcmoreira.pdf> Acesso em: 20.jan.2017.

NEVES,W.S; MONTEIRO,T.S.A; OLIVEIRA,R.D; CASTRO,D.B. **Primeiro relato de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira na região de Jaíba, norte de Minas Gerais.** V.4, N.2. 2010. Disponível em: <http://www.periodicoeletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/150/99> Acesso em: 19 de junho de 2017.

7 APÊNDICE

=====

ASSISTAT Versão 7.7pt(2017)-Homepagehttp://www.assistat.com

Por Francisco de A. S. e Silva-CG-Brasil-Atualiz.01/03/2017

=====

Arquivo temporário Data 16/06/2017 Hora 08:49:27

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1 (F1)	2	7374.11111	3687.05556	200.0728 **
Fator2 (F2)	1	64.22222	64.22222	3.4849 ns
Int. F1xF2	2	1965.44444	982.72222	53.3260 **
Fat xTestemun	1	122.03175	122.03175	6.6219 *
Tratamentos	6	9525.80952	1587.63492	86.1507 **
Resíduo	14	258.00000	18.42857	
Total	20	9783.80952		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
2	14	6.5149	200.0728	<.0001
1	14	4.6001	3.4849	0.0829
2	14	6.5149	53.326	<.0001
1	14	4.6001	6.6219	0.0221
6	14	4.4558	86.1507	<.0001

Fator 1 = QUANTIDADE DE ÁGUA

Fator 2 = QUANTIDADE DE SOLO

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	80.33333	
2	53.33333	
3	69.33333	
4	61.33333	
5	11.33333	
6	35.00000	
Test	58.66667	

dms = 10.19984

Foi aplicado o Teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade (bilateral)

Médias do fator 1		
1	66.83334	a
2	65.33334	a
3	23.16667	b

dms =	6.48443	

Médias do fator 2		
1	53.66667	a
2	49.88889	a

dms =	4.33578	

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B	
	B1	B2
A1	80.3333 aA	53.3333 aB
A2	69.3333 bA	61.3333 aB
A3	11.3333 cB	35.0000 bA

dms para colunas = 9.1704 dms para linhas = 7.5098

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras Maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 52.76190
8.14

CV% =

Ponto médio = 45.50000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

```
-----
Teste (Estatística)  Valor  p-valor  Normal
Shapiro-Wilk (W)    0.90757  0.04919  Não
-----
```

DADOS

```
-----
82  80  79
44  59  57
72  69  67
56  63  65
12  13   9
39  36  30
61  59  56
-----
```

OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse Caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

SIGLAS E ABREVIações

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade
 SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 dms = Diferença mínima significativa

REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric.

Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS:Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho=12