

MÉTODO DE DETECÇÃO DE NEMATÓIDES DAS GALHAS EM TOMATEIRO



FICHA TÉCNICA

JOSÉ CARLOS LAMBERT
MONIQUE MOREIRA MOULIN
ANTÔNIO FERNANDO DE SOUZA



Vitória, ES
2023



Editora do Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Espírito Santo

R. Barão de Mauá, nº 30 – Jucutuquara

29040-689 – Vitória – ES

www.edifes.ifes.edu.br | editora@ifes.edu.br

Reitor: Jadir José Pela

Pró-Reitor de Administração e Orçamento: Lezi José Ferreira

Pró-Reitor de Desenvolvimento Institucional: Luciano de Oliveira Toledo

Pró-Reitora de Ensino: Adriana Piontkovsky Barcellos

Pró-Reitor de Extensão: Lodovico Ortlieb Faria

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação: André Romero da Silva

Coordenador da Edifes: Adonai José Lacruz

Conselho Editorial

Aline Freitas da Silva de Carvalho * Aparecida de Fátima Madella de Oliveira * Eduardo Fausto Kuster Cid *
Felipe Zamborlini Saiter * Gabriel Domingos Carvalho * Jamille Locatelli * Marcio de Souza Bolzam *
Mariella Berger Andrade * Ricardo Ramos Costa * Rosana Vilarim da Slva * Rossanna dos Santos Santana
Rubim * Viviane Bessa Lopes Alvarenga.

Revisão de texto: **Projeto gráfico:** **Diagramação:** **Capa:** **Imagem de capa:**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Bibliotecário responsável: Domingos Sávio Côgo - CRB6-ES nº 430

L222r	Lambert, José Carlos. Método de detecção de nematoides das galhas em tomateiro / José Carlos Lambert, Monique Moreira Moulin, Antônio Fernando de Souza - Vitória: Edifes Acadêmico, 2023. 17f.: il. ISBN: 978-85-8263-721-0. Formato: livro digital Veiculação: digital 1. Nematóide das galhas. 2. Resistência genética. 3. Tomate. I. Moulin, Monique Moreira. II. Souza, Antônio Fernando de. III. Instituto Federal do Espírito Santo. IV. Título. CDD 23– 630.2745
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

DOI: 10.36524/9788582637210

Esta obra está licenciada com uma Licença Atribuição – Não Comercial - Sem Derivações 4.0 Brasil.



APRESENTAÇÃO

Nematoides parasitas de plantas são pragas importantes na maioria dos sistemas produtivos. Os fitonematoides são ainda relativamente pouco conhecidos do homem, apesar dos enormes prejuízos que podem causar às espécies cultivadas.

Espécies do gênero *Meloidogyne*, conhecidas por nematóides das galhas, são endoparasitas sedentários, altamente especializados em contornar resistência para estabelecer interações compatíveis. Entretanto, a resistência genética se constitui na estratégia mais eficiente e de maior sustentabilidade para o controle de *Meloidogyne* spp.

Este manual é produto da dissertação de mestrado intitulada “Reação de genótipos *Solanum lycopersicum* ao parasitismo por *Meloidogyne incognita*”, cujo objetivo é descrever os métodos utilizados nos experimentos com tomateiro. São práticas usadas em laboratórios e em experimentos de pesquisa envolvendo nematóides.

Espera-se que tais metodologias possam ser empregadas por diferentes segmentos agrícolas, tais como ensino, pesquisa e setor de produção.

SUMÁRIO

Introdução	04
Diagnose de nematoides	05
Amostragem	05
Extração de nematoides das raízes	05
Obtenção do inóculo inicial de <i>Meloidogyne</i> spp.	10
COLORAÇÃO DE MASSA DE OVOS DE <i>Meloidogyne</i> spp.	11
PURIFICAÇÃO DE <i>Meloidogyne</i> spp.	12
MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO INICIAL DE <i>Meloidogyne</i> spp.	12
IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE <i>Meloidogyne</i> spp.	13
Inoculação de <i>Meloidogyne</i> spp.	13
CALIBRAÇÃO DA SUSPENSÃO DE INÓCULO	13
INOCULAÇÃO	14
Referências	15

Introdução

Nematoides parasitas de plantas são parasitas obrigatórios, pois somente se alimentam de células de plantas vivas. Normalmente são encontrados no solo e nas raízes das plantas, sendo a maioria das espécies, microscópica.

A presença de nematoides associados ao sistema radicular das plantas provoca alterações nas raízes, prejudicam o processo de absorção de água e de nutrientes, resultando em plantas pouco produtivas (PINHEIRO, 2022).

Sintomas na parte aérea, geralmente compreendem sintomas indefinidos de crescimento, tais como enfezamento, amarelecimento e murcha. Os sintomas podem ser confundidos principalmente com os de deficiência mineral, sendo o diagnóstico da doença, confirmado através de análises laboratoriais de amostras de solo e raízes, com objetivo de determinar a densidade populacional e a espécie (BRIDA et al., 2018; SILVA et al., 2016).

Espécies do gênero *Meloidogyne*, conhecido por nematoides das galhas radiculares são endoparasitas sedentários. Está entre os patógenos mais nocivos à agricultura, parasitando inúmeras culturas de importância econômica (ARAÚJO FILHO et al., 2016; BRIDA et al., 2018).

Dentre as mais de 100 espécies descritas, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica* causam a maioria dos danos registrados nos cultivos agrícolas. c (NOE, 2010).

Para a maioria dos cultivos, a resistência é o único modo prático de controlar nematoides parasitas de plantas, pois culturas resistentes são econômicas, vez que pouco ou nenhum custo adicional é desembolsado pelos produtores. Igualmente sob o ponto de vista do impacto ambiental, cultivares resistentes são consideradas as melhores escolhas de práticas de controle (NOE, 2010).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) tem grande suscetibilidade ao nematoide-das-galhas, cujas espécies com maior distribuição em tomateiros no Brasil são *M. javanica* e *M. incognita* (PINHEIRO et al., 2014). A seleção de genótipos de tomate mais produtivos e fonte de resistência à doenças, é de grande relevância para futuras indicações ao produtor rural, pois lhe faculta evitar o emprego de agrotóxicos, possibilitando melhorar sua renda e manter sua saúde.

O objetivo do presente manual é descrever métodos utilizados em nematologia para diagnose de nematoides. Inclui amostragem, extração, obtenção de inóculo e inoculação de nematoides. São práticas usadas em laboratórios e em experimentos de pesquisa envolvendo nematoides.

Diagnose de nematoides

O primeiro passo, para a correta diagnose de nematoides, em áreas destinadas a fins agrícolas é a amostragem, que deve representar adequadamente a distribuição do nematoide na área (SILVA e MACHADO, 2019).

Amostragem

Para coleta de amostras de partes vegetais em lavouras hortícolas, a exemplo do tomateiro, a recomendação é de 3 a 5 amostras de raízes e cerca de 100 g de radículas devem compor a amostra composta (PINHEIRO, 2017). Deve-se amostrar plantas com sintomas e/ou sinais da doença. Sintomas na parte aérea compreendem sintomas indefinidos de crescimento, tais como enfezamento, amarelecimento e murcha (Figura 1A). Os principais sinais são as galhas presentes nas raízes (Figura 1B).

Figura 1. Tomateiros com sintomas (A) e raízes com sinais de nematose (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Acondicionar as amostras de raízes em sacola plástica com um pouco de solo para conservação da umidade. Identificar a amostra, anotando nome do produtor, nome da propriedade, talhão, espécie de planta, cultivar, data de coleta. As amostras devem ser enviadas o mais rápido possível ao laboratório para análise, devidamente acondicionadas em caixas de isopor, para evitar o aquecimento das mesmas (SILVA e MACHADO, 2019).

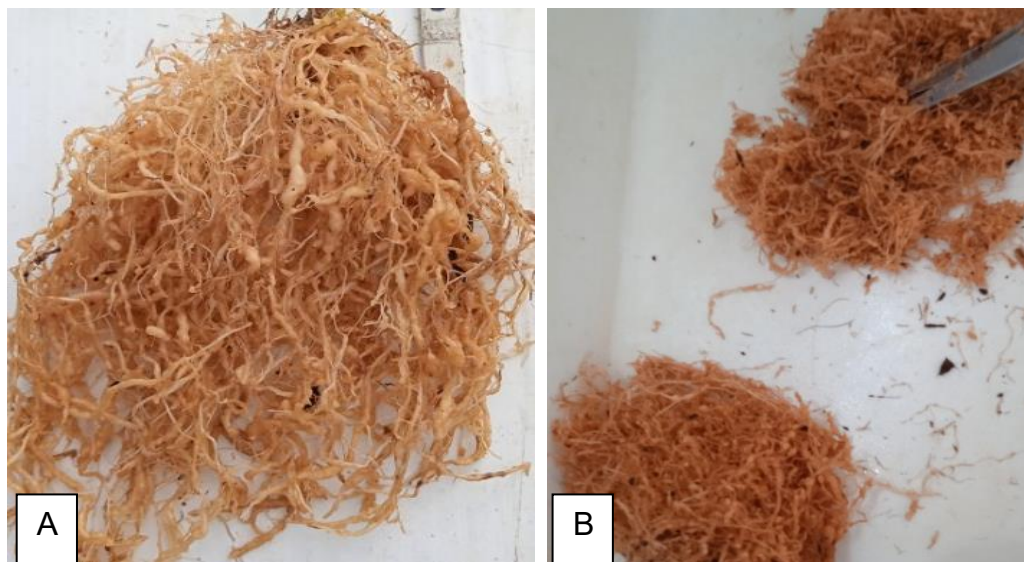
Extração de nematoides das raízes

Uma vez coletada a amostra, o próximo passo é a extração dos nematoides presentes nas raízes enviadas ao laboratório. Extração de nematoides de tecidos vegetais a exemplo de raízes de tomateiro deve ser por trituração seguida de flotação e centrifugação (COOLEN

e D'HERDE, 1972) com modificações. Essa metodologia é amplamente utilizada pelos laboratórios brasileiros para extração de espécimes ativos e inativos.

Lavar as raízes (Figura 2A) e cortá-las em pedaços de cerca de 1 centímetro (Figura 2B).

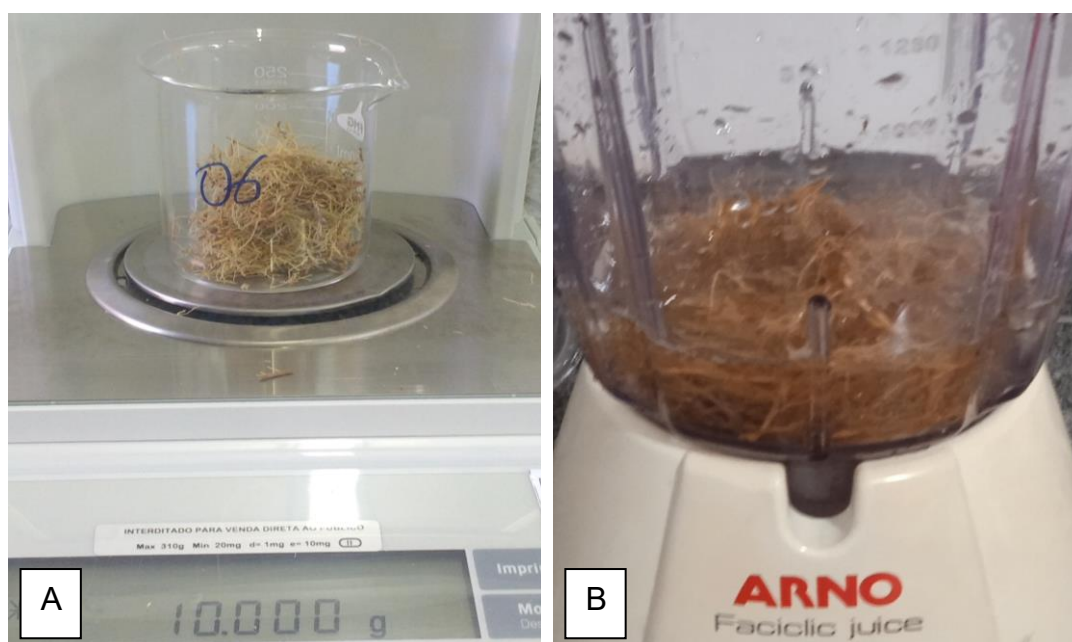
Figura 2. Raízes de tomateiro lavadas (A) e picadas (B) para extração de nematoides.



Fonte: Autoria própria (2022).

Pesar 10g das raízes picadas (Figura 3A) e triturá-las por 30 segundos em liquidificador a baixa rotação (Figura 3B), contendo solução aquosa de hipoclorito de sódio (NaOCL) a 0,5% (para desagregar a massa de ovos) em volume suficiente para cobrir a massa de raízes.

Figura 3 – Pesagem de raízes de tomateiro (A) e trituração em liquidificador (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Verter a suspensão obtida em peneira de malha 20 *mesh* acoplada sobre outra de 500 *mesh* (Figura 4A). Lavar o material retido na segunda peneira (Figura 4B) para remoção do hipoclorito e não deixar jato de água cair diretamente sobre a massa de raízes.

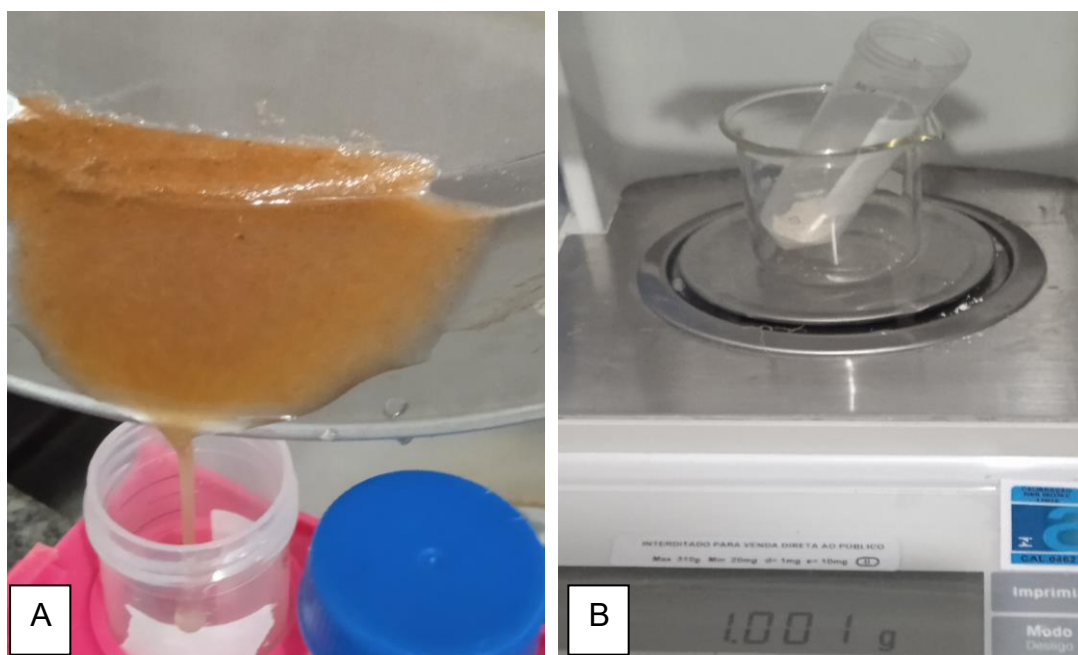
Figura 4. Peneiramento da massa de raízes (A) e lavagem do material retido (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Com auxílio de uma pisseta com água, recolher o conteúdo da peneira de 500 *mesh* em tubos de centrifuga (Figura 5A). Cada tubo deve conter 1 grama de caulim (Figura 5B).

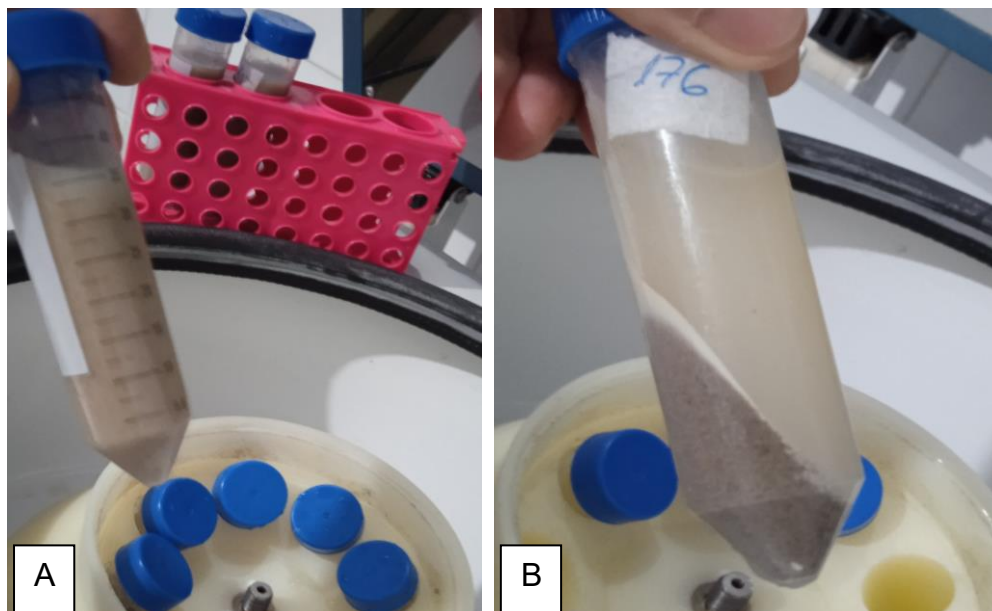
Figura 5. Recolhimento do conteúdo da peneira 500 *mesh* (A) em tubo contendo 1g de caulim (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Balancear (dosar com a mesma massa ou volume da suspensão) e agitar os tubos para homogeneizar o conteúdo (Figura 6A) e centrifugar por 4 minutos a 1750 rpm (Figura 6B).

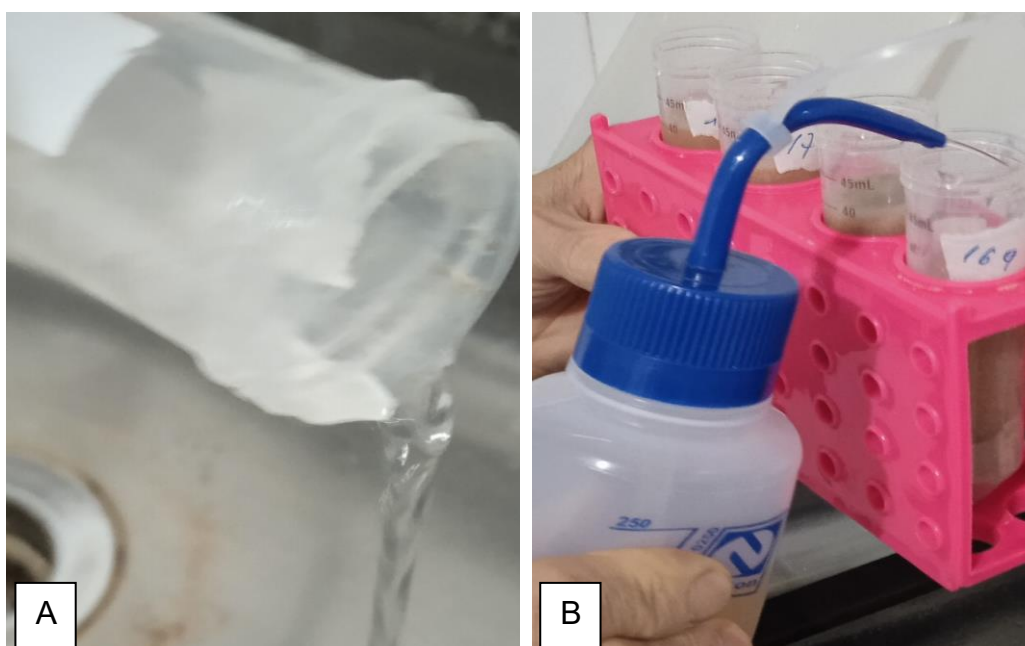
Figura 6. Agitação dos tubos contendo raízes de tomateiro trituradas e caulim (A) e centrifugação dos tubos por 4 minutos (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Em seguida descartar o líquido sobrenadante (Figura 7A) e ao precipitado adicionar solução de sacarose (454g de açúcar dissolvido em 750 ml de água) (Figura 7B). Balancear, homogeneizar e centrifugar novamente por 1 minuto a 1750 rpm.

Figura 7. Descarte de líquido sobrenadante (A) e adição de sacarose (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Verter o líquido sobrenadante em peneira de 500 *mesh* (Figura 8A) e lavar conteúdo sob a torneira para retirada do excesso de sacarose, evitando jato d'água direto sobre o material retido na peneira (Figura 8B).

Figura 8. Passagem do sobrenadante em peneira 500 *mesh* (A) e lavagem do conteúdo sob torneira (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Recolher a suspensão da peneira em um pequeno becker (Figura 9A) com auxílio de uma pisseta e em seguida transferir para tubo de ensaio para avaliação (Figura 9B).

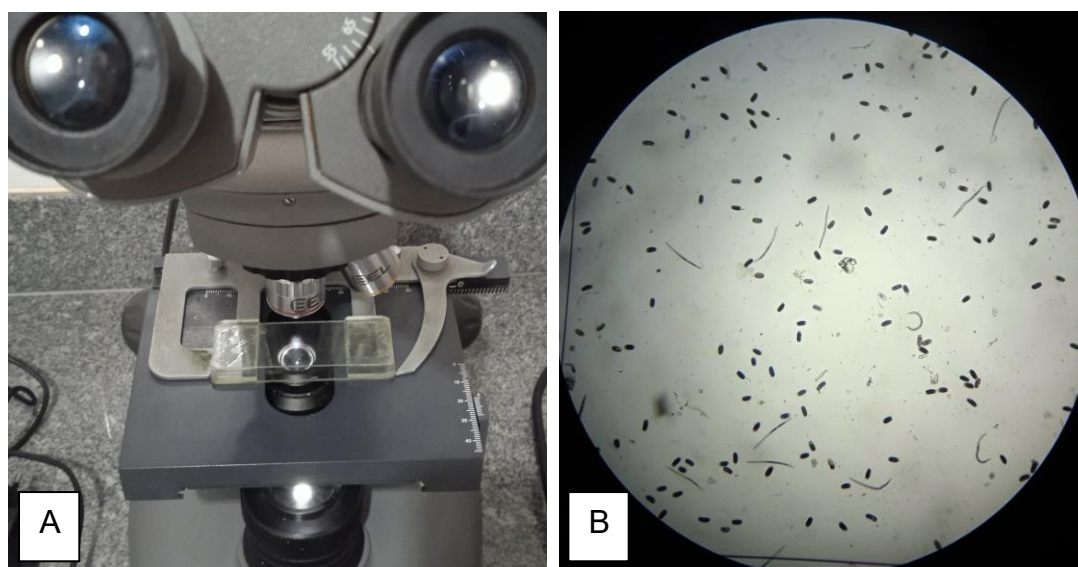
Figura 9. Recolhimento de suspensão em becker (A) e transferência para tubo de ensaio (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Com auxílio de uma pipeta homogeneizar a suspensão e transferir 2-3 ml para a lâmina de Peters ao microscópio óptico (Figura 10A) para visualizar e quantificar o número de ovos+J2 presentes na suspensão (Figura 10B). Contar os nematóides em 12 quadrantes da lâmina em duas leituras distintas, somar os valores resultantes, obtendo assim o número médio de ovos+J2 em 1 ml da suspensão.

Figura 10. Uso da lâmina de Peters (A) para visualizar e quantificar ovos+J2 (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Obtenção do inóculo inicial de *Meloidogyne* spp.

A seleção da população do nematoide utilizada para **inoculação** em plantas é etapa crucial para o sucesso da experimentação nematológica. Embora haja variações nos objetivos de diferentes pesquisas conduzidas em ambiente controlado, por exemplo, caracterização da reação de cultivares (se resistentes ou suscetíveis) a determinada espécie de nematoide, os procedimentos para inoculação das plantas com os nematoides seguem metodologia praticamente única, pelos pesquisadores brasileiros (MACHADO, SILVA e FERRAZ, 2019).

Independente do objetivo, a população a ser utilizada como inóculo tem que estar **purificada**, ou seja, conter apenas a espécie desejada para a realização do experimento. Uma população é considerada pura quando obtida pela multiplicação de uma única massa de ovos, cujo processo é detalhado a seguir:

O processo se inicia com a coleta de raízes de plantas hospedeiras (tomateiro) sintomáticas, ou seja, contendo galhas, pois o objetivo é remover massas de ovos presentes nas superfícies das mesmas para purificação e multiplicação.

Para melhor visualização e seleção das massas de ovos, as raízes devem ser coradas, evidenciando as massas sobre as galhas.

COLORAÇÃO DE MASSA DE OVOS DE *Meloidogyne* spp.

Segundo Rocha et al. (2005), resultados satisfatórios são obtidos quando da coloração de raízes com corantes da indústria alimentícia contendo vermelho-Bordeaux. Esta metodologia tem a grande vantagem de baratear o custo do processo de coloração de nematoides. Descrita a seguir:

Lavar as raízes com cuidado para não desagregar as massas de ovos. Preparar solução aquosa a 1% do produto comercial e mergulhar as raízes por 20 minutos (Figura 11A) e em seguida remove-las para recipiente com água por 15 minutos para remoção do excesso do corante. Acomodá-las sobre papel toalha por 10 minutos para absorção do excesso de água (Figura 11B).

Figura 11. Coloração de raízes com corante vermelho-Bordeaux (A e B).

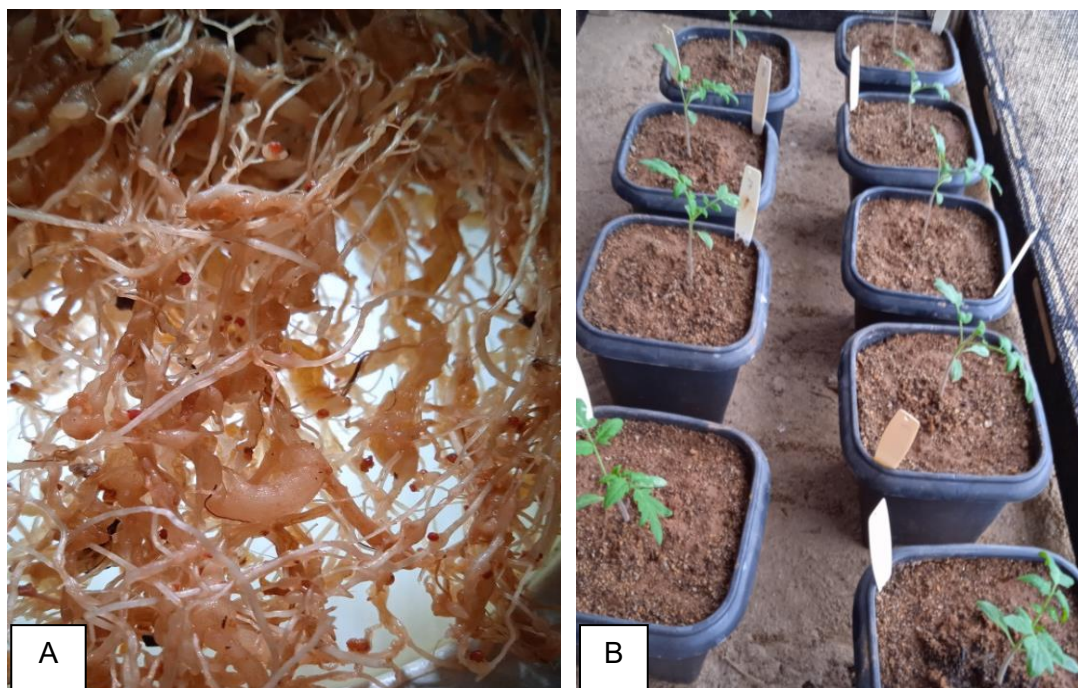


Fonte: Autoria própria (2022).

Levar as raízes coradas ao microscópio estereoscópico (Figura 12A) e com auxílio de um bisturi remover individualmente pelo menos 10 (dez) massas de ovos e colocar cada uma em um microtubo contendo 1 ml de água. Resultará em 10 suspensões de 1 ml contendo uma massa de ovos cada. Neste momento deve haver pelo menos 10 mudas de tomate suscetível a *Meloidogyne* spp. (por ex. cultivar Santa Clara) prontas para o processo de purificação da população de *Meloidogyne* spp. (Figura 12B).

Figura 12. Raízes coradas evidenciando massas de ovos (A) e mudas de tomate prontas

para receber inóculo de massa de ovos (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

PURIFICAÇÃO DE *Meloidogyne* spp.

Mudas de tomateiro devem ser produzidas (cultivar suscetível) em recipientes de aproximadamente 100ml contendo substrato estéril e transplantadas quando atingirem 2 a 3 pares de folhas definitivas para vasos de 2 a 3 litros contendo substrato a base de solo+areia, na proporção de 3:1, esterilizado (em autoclave por 2 períodos de 30 minutos com intervalo de 24 horas).

Inocular individualmente cada suspensão obtida de 1ml contendo uma massa de ovos em plantas de tomate com 8 dias de transplantadas. Fazer 3 furos em torno do colo da planta e verter a suspensão de inóculo. Serão 10 vasos contendo uma planta cada, inoculadas com uma única massa de ovos cada.

Manter a plantas em ambiente protegido e irrigadas por 8 semanas. Após este período, retirar os tomateiros dos vasos, desprezar a parte aérea, lavar o raizame de cada planta para remoção do substrato residual e analisar visualmente quanto à presença de galhas.

Aquele tomateiro cujo sistema radicular apresentar maior densidade de galhas deve ser selecionado para multiplicação do inóculo inicial.

MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO INICIAL DE *Meloidogyne* spp.

Submeter o sistema radicular selecionado a processo de extração de ovos (COOLEN e D'HERDE, 1972) e inocular em novos tomateiros. O substrato usado nesta etapa

(multiplicação) deve ser composto por solo+areia (3:1) e desinfestado por meio de tratamento térmico com uso de energia solar conforme Ghini e Bettiol (1991).

Figura 13. Multiplicação do inóculo inicial de *Meloidogyne* spp.



Fonte: Autoria própria (2022).

IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE *Meloidogyne* spp.

A identificação da população inicial de *Meloidogyne* spp. geralmente é feita por eletroforese de isoenzimas conforme Carneiro e Almeida (2001). Portanto, amostra de raízes do tomateiro selecionado contendo galhas deve ser enviada a laboratório especializado para identificação da espécie.

Inoculação de *Meloidogyne* spp.

Danos causados às plantas por nematoides fitoparasitas na lavoura podem ser facilmente reproduzidos em casas de vegetação. Diferentes pesquisas nematológicas são conduzidas em ambiente controlado, por exemplo, caracterização da reação de cultivares (se resistentes ou suscetíveis). Portanto a inoculação de suspensão contendo ovos+J2 de nematóides é uma praxe na pesquisa nematológica.

Uma vez obtida a suspensão contendo os espécimes que serão utilizados como inóculo, a correta calibração (Figura 14) para a quantidade desejada também se configura importante etapa para o sucesso do experimento. Portanto, imediatamente após o processo de extração deve-se quantificar a população contida no volume inicial da suspensão para calibração e inoculação.

CALIBRAÇÃO DA SUSPENSÃO DE INÓCULO

Para calibração do inóculo para a densidade populacional do nematoide desejada, basta utilizar a fórmula química abaixo, para calibração de volumes e concentrações de reagentes:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Onde:

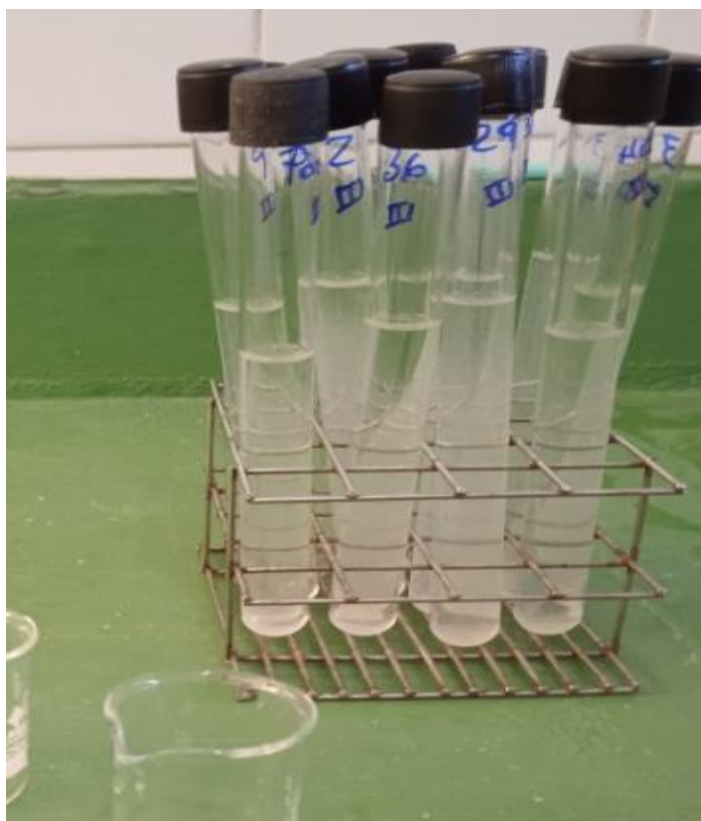
C_i = Concentração inicial da suspensão de nematóides;

V_i = Volume inicial da suspensão;

C_f = Concentração final desejada

V_f = Volume final da suspensão

Figura 14. Calibração da suspensão de inóculo.



Fonte: Autoria própria (2022).

INOCULAÇÃO

Com a suspensão de inóculo quantificada, calibrada e contida em um frasco com tampa, o próximo passo é realizar 2-3 orifícios de 1-2 cm de profundidade ao redor do colo da planta, de maneira a garantir que o inóculo seja colocado o mais próximo das raízes. Com auxílio de uma pipeta graduada (soprando-se o ar com a boca para o interior do frasco), a suspensão deve ser homogeneizada a cada planta inoculada para garantir sua concentração. A inoculação pode ser realizada com auxílio da mesma pipeta de vidro ou com pipetador semi automático (mais eficiente) calibrado para o volume a ser aplicado por

planta (Figura 15A). Após o término da inoculação, realizar rega leve nos vasos, garantindo que não haverá perda da viabilidade dos nematoides por desidratação e manter plantas em ambiente protegido, tipo um viveiro telado (Figura 15B).

Figura 15. Processo de inoculação (A) e disposição das plantas em viveiro após inoculação (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Referências

ARAÚJO, J. C.; TELHADO, S. F. P.; SAKAI, R. H.; LEDO, C. A. S.; MELO, P. C. T. Univariate and multivariate procedures for agronomic evaluation of organically grown tomato cultivars. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 374-380, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-05362016003011>. Acesso em: dez. 2022.

BRIDA, A. L.; CASTRO, B. M.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E.; WILCKEN, S. R. S. Oat, wheat and sorghum cultivars for the management of *Meloidogyne enterolobii*. **Nematology**, v. 20, n. 2. p. 170-173, 2018.

CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, 25: 35-44, 2001.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent, Belgium. **State Nematology and Entomology Research Station**, 1972, 77 p.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Coletor solar para desinfestação de substratos. **Summa Phytopathologica**, v. 17, n. 3/4, p. 281-286, 1991.

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

MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. C. B. Preparo do inoculo e inoculação em plantas. In: MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. C. B. Métodos em nematologia agrícola. Piracicaba: **Sociedade Brasileira de Nematologia** , 2019. 184p.

NOE, J. P. Nematoides Parasitas de Plantas. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. Fitopatologia: Conceitos e Exercícios de Laboratório. 2. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010. 576 p.:il.; 28cm.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; SUINAGA, F. A. Manejo de nematoides na cultura do tomate. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 2014 (Circular Técnica n. 132).

PINHEIRO, J.B. Amostragem para diagnose de nematoides em cultivos de hortaliças. In: PINHEIRO, J.B. (Ed.). Nematoides em Hortaliças. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 2017, pp. 133-138.

PINHEIRO, J. B. Pimenta. Doenças. Nematoides - Portal Embrapa, Brasília: **Embrapa Hortaliça**, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br>> doenças > nematoides. Acesso em: jun. 2022.

ROCHA, F. S.; MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P. Coloração de fitonematoides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. **Nematologia Brasileira** 29: 293-7, 2005.

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

SILVA, R. C.; GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A. Deciphering genetic diversity in the origins of pepper (*Capsicum* spp.) and comparison with worldwide variability. **Crop Science**, v. 56, n. 6, p. 3100-3111, 2016.

REALIZAÇÃO

