



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

INFECTIVIDADE DE JUVENIS DE *Heterodera glycines* EM RAÍZES DE PLANTAS DE SOJA ORIUNDAS DE SEMENTES TRATADAS COM DIFERENTES PRODUTOS

Jefferson de Oliveira Barizon¹; Walber Luiz Gavassoni²; Cassia de Carvalho³; Bruno Cesar Alvaro Pontim³; Nadine E. Padovan Branquinho⁴; Lilian Maria Arruda Bacchi⁵

¹Graduando em Agronomia UFGD, Bolsista PIBIC/CNPq, e-mail: jeffersonbarizon@hotmail.com;

²Orientador, Professor Associado FCA/UFGD, e-mail: walbergavassoni@ufgd.edu.br;

³Doutorandos PGAGRO/FCA/UFGD

⁴Acadêmica do curso de graduação em Agronomia UFGD

⁵Professor Associado FCA/UFGD.

RESUMO

O nematoide *Heterodera glycines*, conhecido como nematoide de cisto da soja, é um dos patógenos de maior importância para a cultura da soja no Brasil, devido principalmente, à dificuldade de medidas eficazes de controle. As fêmeas de *H. glycines* realizam oviposição interna, e quando morrem seus cadáveres são convertidos em estruturas que protegem os ovos contidos em seu interior. Essas estruturas são chamadas de cistos. Neste trabalho foi avaliada a eficácia de produtos utilizados em tratamento de sementes de soja no controle da infectividade de juvenis de *H. glycines*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados. Foram utilizadas sementes de soja cultivar BMX Magna RR ‘Don Mario 7.0i’, seis tratamentos, sendo estes, uma testemunha e cinco produtos comerciais, Avicta Completo[®], Poncho[®], Poncho/Votivo[®], Standak Top[®] e Cropstar[®]. As sementes de soja, após tratadas, foram semeadas em bandejas plásticas contendo areia fina e sete dias após a emergência, foram transplantadas para copos plásticos de 80mL, com o mesmo substrato, onde dois dias após o transplante,

foram inoculadas com 30 juvenis de segundo estágio (J2) de *H. glycines*. As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação, através do processo de coloração de nematoides em tecidos vegetais com fucsina ácida e os nematoides presentes foram quantificados sob microscópio estereoscópico. O tratamento de sementes com Avicta Completo® proporcionou um menor nível populacional de nematoides nas raízes aos 21 dias após a inoculação, em relação à testemunha. Concluiu-se que o tratamento de sementes pode ser uma ferramenta adicional viável no manejo de *H. glycines* na cultura da soja.

PALAVRAS-CHAVE: Doenças da soja, *Glycine max*, nematoide de cisto da soja.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo, participando com 51% do total das principais oleaginosas. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja, com uma área plantada de cerca de 30 milhões hectares e produção estimada em 86 milhões de toneladas na safra 2013/2014 (CONAB, 2014).

O nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952), constitui-se num dos principais fatores limitantes para a produção dessa leguminosa em todo o mundo (WRATHER et al., 1997; SCHIMITT et al., 2004; SCHUMANN; D'ARCY, 2012). A doença causada por este nematoide, primeiramente observada no Japão em 1915, recebeu a denominação de nanismo amarelo, devido aos sintomas exibidos pelas plantas infectadas. A infecção por *H. glycines* pode resultar em perdas elevadas na produção ou até mesmo na destruição total das lavouras, obrigando os produtores a abandonarem as áreas infestadas por longo período (SCHIMITT et al., 2004).

Teve seu primeiro relato no Brasil na safra de 1991/92, e atualmente, está presente em cerca de 150 municípios de 10 Estados (MG, MT, MS, GO, SP, PR, RS, BA, TO e MA) com uma área infestada superior a 3,0 milhões de ha (EMBRAPA, 2010). Recentemente foi detectado na região Centro-Sul de Mato Grosso do Sul, que até então estava aparentemente restrito ao Norte e Nordeste do estado (LAFOURCADE; TELES, 2011).

O controle de *Heterodera glycines*, é bastante complexo. Primeiramente, medidas preventivas devem ser tomadas, evitando a introdução destes organismos em áreas onde ainda não estão presentes (FERRAZ et al., 2001). Uma vez presente no solo, o nematoide de cisto da soja (NCS) não pode ser eliminado, entretanto, deverá ser manejado para minimizar sua reprodução e maximizar a produção da soja (TYLKA, 1995). O manejo da cultura da soja para o controle do NCS baseia-se na manipulação de algumas práticas culturais, visando reduzir a população e criar condições desfavoráveis ao desenvolvimento do nematoide no solo. Com isso, qualquer prática que reduza o estresse deverá aumentar a capacidade das plantas em tolerar o parasitismo do nematoide (SCHIMITT et al., 2004).

De acordo com Lovato et al. (2007a), o controle com nematicidas eficazes, via tratamento de sementes, pode ser uma alternativa segura sob os aspectos toxicológicos e ambientais e com maior viabilidade técnica e econômica para o produtor. Existem poucos trabalhos avaliando a eficácia de produtos aplicados via tratamento de sementes no controle de nematoides. A aplicação de imidacloprid e thiodicarb em sementes de soja resultou em menor número de galhas, juvenis e fêmeas de *Meloidogyne javanica*. São escassos os trabalhos com o nematoide de cisto da soja

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de produtos utilizados em tratamento de sementes de soja no controle da infectividade de juvenis de *Heterodera glycines*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia e em casa de vegetação, ambos localizados na Unidade II da Universidade Federal da Grande Dourados. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos, seis repetições e cinco épocas de avaliação.

1. Multiplicação, extração e preparo da suspensão de ovos

A população inicial de *H. glycines* raça 3, utilizada no ensaio, foi obtida de uma área naturalmente infestada do município de Chapadão do Sul, MS. O solo contendo os cistos foi disponibilizado pelo Dr. Guilherme Lafourcade Asmus, nematologista da

Embrapa Agropecuária Oeste. Neste solo foram cultivadas plantas de soja cultivar BMX Magna RR 'Don Mario 7.0i', para a multiplicação do inóculo, em bandejas com capacidade para 5000 mL, contendo como substrato solo + areia grossa (1:1) autoclavado e mantidos em casa de vegetação.

Para a extração dos cistos e fêmeas, as plantas multiplicadoras foram retiradas da bandeja, seus sistemas radiculares foram cuidadosamente limpos com um jato fraco de água corrente, para eliminação do excesso de solo. Após a limpeza, as raízes foram submetidas a um jato forte de água sobre peneira de 60 mesh acoplada a outra de 200 mesh. A suspensão contendo cistos e fêmeas foi processada para separação e retirada de qualquer impureza presente (DUNN, 1969).

Os cistos e fêmeas foram esmagados com auxílio de um tubo macerador de tecidos para liberação dos ovos, a seguir esta suspensão foi vertida sobre uma peneira 500 mesh, onde somente os ovos ficaram retidos (ACEDO; DROPKIN, 1982). Utilizando-se de um microscópio estereoscópico e câmara de Peters, a suspensão de ovos foi ajustada para 100 ovos mL⁻¹.

Cinquenta mililitros (5.000 ovos) da suspensão de ovos foram transferida para cada câmara de eclosão (CE). As CE eram constituídas de peneira plástica forrada com duas folhas de lenço de papel e apoiada sobre almofariz de porcelana com capacidade para 250 mL. Água destilada foi acrescentada em cada câmara até completar a sua capacidade. As CE foram, então, transferidas para câmara de incubação ajustada para 25°C ± 1 °C, em regime de escuro contínuo. A cada 24 horas de incubação, e até 72 horas, fez-se o recolhimento dos juvenis de segundo estágio (J2), eclodidos no período. Os juvenis foram armazenados em refrigerador a 5°C ± 1°C. A metodologia encontra-se ilustrada na Figura 1.

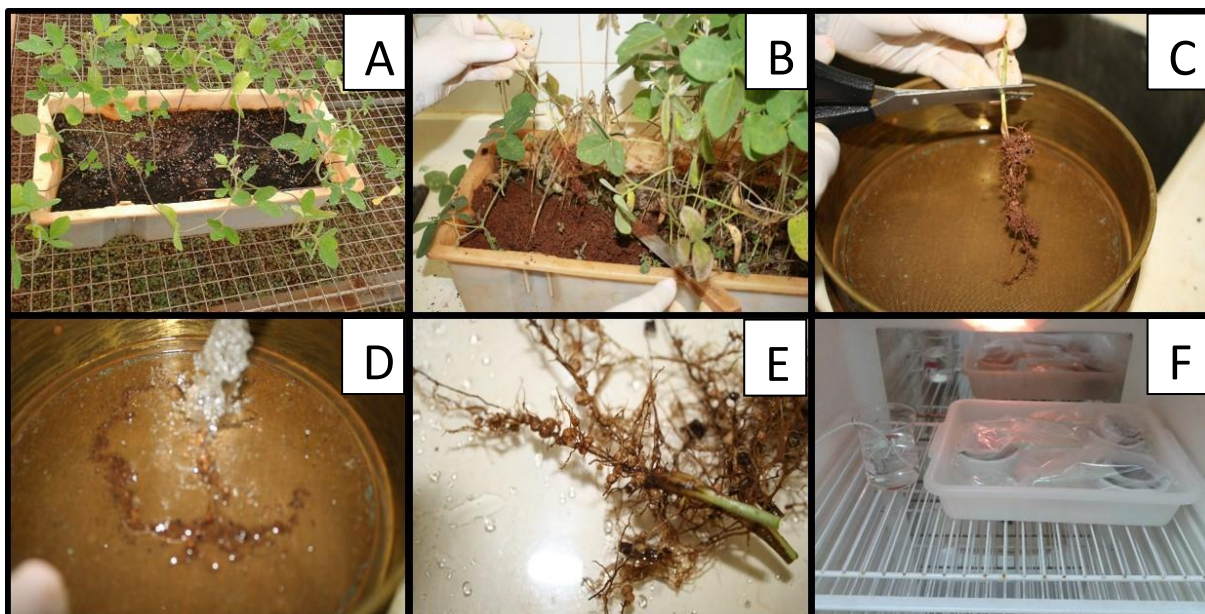


Figura 1. Multiplicação do inoculo de *Heterodera glycines* (A); Processo de extração de cistos das raízes de plantas inoculadas (B, C, D, E); Câmaras de eclosão em incubadora (F).

2. Tratamentos

Os tratamentos consistiram no tratamento de sementes com cinco produtos, cujos nomes comerciais, ingredientes ativos e doses encontram-se descritos no quadro 1. Como testemunha, apenas água destilada, (600 mL.100kg sementes⁻¹), em um total de seis tratamentos.

Quadro 1. Produtos, ingredientes ativos e doses utilizadas no tratamento de sementes de soja cv. cultivar BMX Magna RR ‘Don Mario 7.0i.

Produto Comercial	Ingrediente ativo	Dose p.c. (mL.100 kg sementes ⁻¹)
Avicta Completo [®]	Abamectina + Thiamethoxam + Fludioxonil + Metalaxil-M	(*)
Poncho [®]	Clotianidina	100
Poncho/Votivo [®]	Clotianidina + <i>Bacillus firmus</i>	70
Standak Top [®]	Fipronil + Piraclostrobina + Tiofanato-metílico	200
Cropstar [®]	Imidacloprido + Tiodicarbe	600

(*) Avicta Completo[®]: Avicta[®] (Abamectina 500 g.L⁻¹) + Cruiser[®] (Thiamethoxam 350 g.L⁻¹) + Maxim XL[®] (Fludioxonil 25 g.L⁻¹ + Matalaxil-M 10 g.L⁻¹), nas doses de 100, 200 e 100 mL p.c. 100 kg sementes⁻¹, respectivamente.

3. Inoculação

Após o tratamento, as sementes de soja foram semeadas em bandejas plásticas contendo areia fina. Sete dias após a emergência (DAE), foram transplantadas para copos plásticos de 80mL, com o mesmo substrato, e dois dias após o transplante (DAT), foram inoculadas depositando-se em dois orifícios com profundidade variando de 2 a 3 cm, equidistantes 0,5 cm do caule, 30 juvenis de segundo estágio (J2) de *H. glycines*.

Quatro dias após a inoculação (DAI), as plantas foram retiradas dos copos, lavadas sobre peneira por 30 segundos para a retirada da areia e eventuais juvenis que poderiam estar em contato com a sua superfície radicular. Posteriormente foram transplantadas para tubetes de 45mm de diâmetro e 145mm de comprimento, contendo como substrato uma mistura de solo + areia grossa + substrato (1:1:1) autoclavada por uma hora, durante três dias (Figura 2).

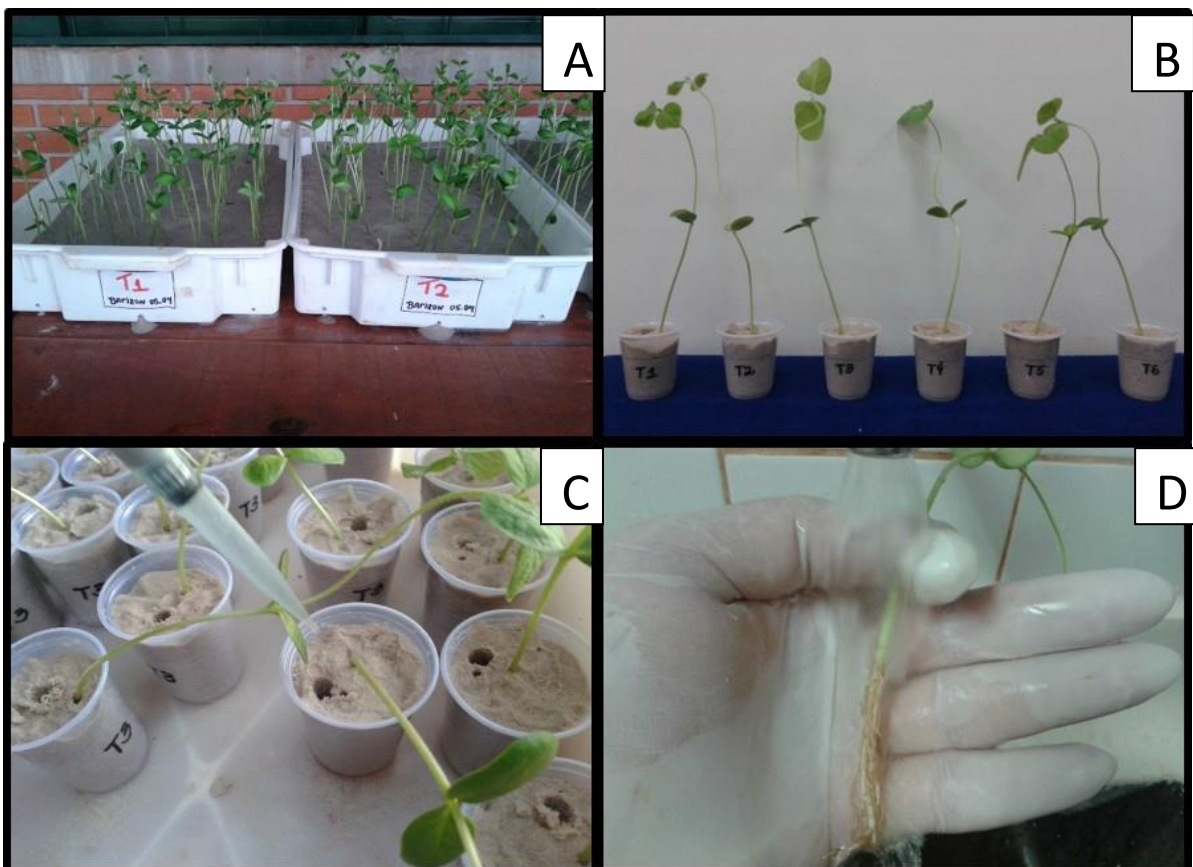


Figura 2. Plântulas de soja cultivar BMX Magna RR ‘Don Mario 7.0i’ em bandejas (A), e posteriormente transplantadas para copos (B) e inoculadas com uma suspensão de ovos de *Heterodera glycines*. Lavagem das raízes aos 4 DAI para remoção do inoculo da superfície das raízes (D).

4. Avaliações

Foram realizadas cinco avaliações sendo estas aos 7, 14, 21, 28 e 35 DAI. Para tanto, seis plantas de cada tratamento foram retiradas dos tubetes, seccionadas separando-se o sistema radicular da parte aérea, as raízes foram lavadas sobre peneira em água corrente e, após secarem sobre papel jornal, foram submetidas ao método de coloração de nematoides em tecidos vegetais com fucsina ácida (BIRD et al., 1983). Na Figura 3 pode observar-se a fase de descoloração (3A) e coloração (3B) para evidenciação da penetração dos nematoides.

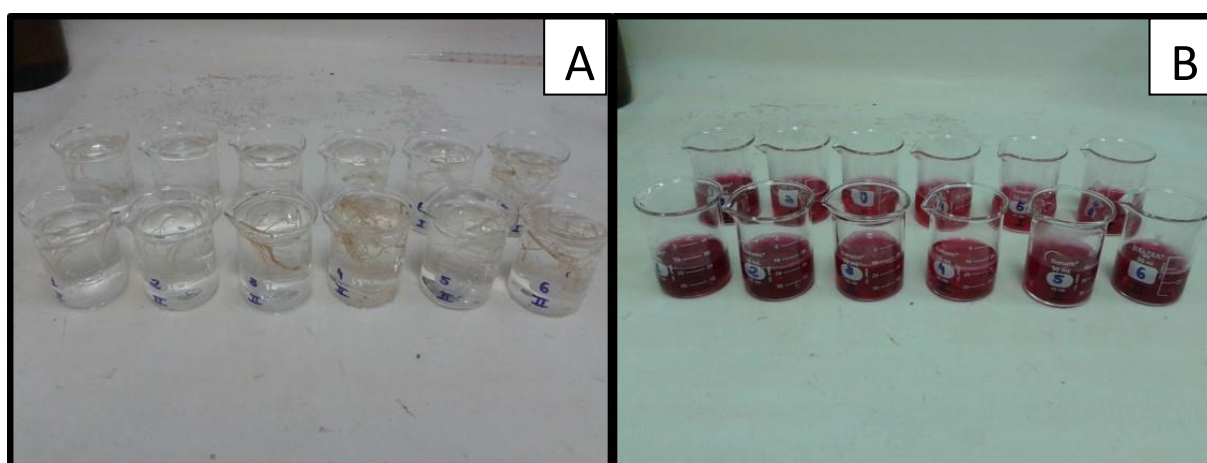


Figura 3. Procedimento para descoloração das raízes de soja em solução de hipoclorito de sódio (A) e coloração de nematoides nas raízes com solução de fucsina ácida (B).

Para quantificação dos nematoides no interior das raízes, estas foram seccionadas e colocadas em lâmina de vidro, sobre as quais foram adicionadas gotas de glicerina e, assim, observada ao microscópio óptico. Quantificou-se o número de nematoides por sistema radicular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de juvenis infectivos nas raízes de soja foi detectada já aos sete dias após a inoculação das plantas. Juvenis infectivos de *H. glycines* ingressam nas raízes através da epiderme e migram pelo córtex pela punção e ruptura das paredes celulares com seus estiletos (GOLINOWSKI et al., 1996). Aos 7 DAI observaram-se entre 1,66 a 7,16 juvenis por sistema radicular de plantas oriundas de sementes tratadas com os diferentes produtos. Entre 6 e 24% dos juvenis inoculados penetraram nas raízes das plantas inoculadas. Em condições monoxênicas aproximadamente 50% dos juvenis infectivos ingressam nas raízes 24h após a inoculação (LAURITIS et al., 1983). O efeito direto dos produtos aplicados via tratamento de sementes não foi detectado aos sete dias da inoculação (Quadro 2). O número de nematoides no interior das raízes também não diferiu aos 14, 28 e 35 dias entre os diferentes tratamentos.

Quadro 2. Número de juvenis e fêmeas de *Heterodera glycines* raça 3 no sistema radicular de soja cultivar BMX Magna RR ‘Don Mario 7.0i’ oriundas de sementes tratadas com diferentes produtos aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação (DAI).

TRATAMENTOS	7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI	35 DAI
Testemunha	2,00 a	4,33 a	3,00 a	14,50 a	23,16 a
Avicta Completo [®]	3,83 a	5,50 a	0,00 b	3,66 a	2,16 a
Poncho [®]	1,66 a	3,33 a	0,50 b	4,33 a	4,33 a
Poncho/Votivo [®]	7,16 a	7,00 a	0,66 ab	5,16 a	10,00 a
Standak Top [®]	4,66 a	6,00 a	2,16 ab	12,00 a	34,83 a
Cropstar [®]	3,83 a	3,16 a	1,50 ab	8,83 a	41,66 a
CV (%)	42,1	36,1	28,5	37,2	74,0

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% ($p > 0,05$). Dados médios de seis repetições. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ para fins de análise estatística. CV (%) = coeficiente de variação.

A presença de fêmeas nas raízes foi somente observada a partir da terceira avaliação, aos 21 dias da inoculação. Nas plantas inoculadas e mantidas até os 21 DAI o efeito do tratamento de sementes ficou evidenciado. A aplicação de Avicta Completo[®], Poncho[®] e Poncho Votivo[®] resultou em menor número de indivíduos de *H. glycines* associados as sementes. Não foram detectados quaisquer nematoides nas raízes de plantas obtidas a partir de sementes tratadas com Avicta Completo[®]. O tratamento de sementes com Poncho[®] e Poncho Votivo[®] resultou em reduções de 83% e 78%, respectivamente.

A aplicação de abamectina mostrou supressão completa do nematoide cisto da soja na avaliação aos 21 dias. O mesmo nematicida (Avicta® 500 FS, dose de 300 ml p.c./100 kg de sementes) na cultura do algodoeiro mostrou eficácia equivalente ou superior ao padrão tratado com aldicarb (Temik® 150) no sulco de plantio, na dose de 12 Kg p.c./ha, na proteção do sistema radicular de cinco cultivares de algodão, testadas contra a penetração de *M. incognita* por (LOVATO et al., 2007a). O efeito da abamectina no tratamento de sementes de algodão sobre *Rotylenchulus reniformes*, também foi verificado por Lovato et al. (2007b) em condições de casa de vegetação, no qual verificaram que o produto ofereceu proteção radicular ao nematoide nos dois níveis de inóculo testados.

A partir dos 28 e 35 dias da inoculação foram observadas a presença de fêmeas com coloração acastanhada. A coloração acastanhada caracteriza que o início da formação dos cistos. O cisto típico de *H. glycines* apresenta coloração marrom escuro e indica que a fêmea está morta e que seu cadáver foi convertido em uma estrutura de proteção dos ovos e juvenis do seu interior (SCHIMITT et al., 2004).

Aos 28 e 35 DAI não detectou-se diferença significativa entre os tratamentos. Possivelmente isso ocorreu devido ao fim do efeito residual dos produtos aplicados as sementes. Isso permitiu a multiplicação dos nematoides presentes (Figura 4).

Nesse trabalho não foi observado supressão da penetração do nematoide nas raízes das plantas em função da aplicação via tratamento de sementes. Somente três semanas após a inoculação que foi possível detectar o efeito. É possível que a ausência do tegumento da semente em condições de pós-inoculação, em função da metodologia empregada tenha tido efeito de redução de tempo de exposição do inóculo ao ingrediente ativo dos produtos. Futuros trabalhos poderão testar esta hipótese deixando o tegumento no substrato nos tubetes após a lavagem das raízes.

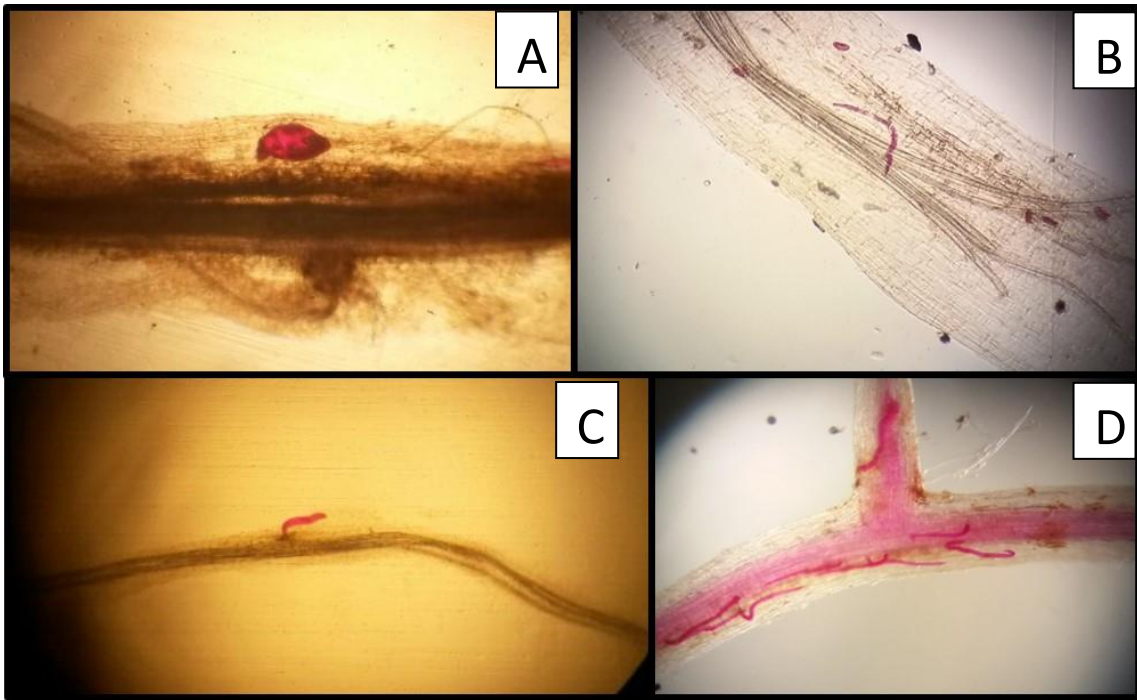


Figura 4. Raízes de soja soja cultivar BMX Magna RR 'Don Mario 7.0i' infectadas por *Heterodera glycines*. Fêmea (A) em raiz aos 21 dias da inoculação, ovos (B) e juvenis iniciando parasitismo nas raízes (C e D).

CONCLUSÃO

Não foi observado efeito do tratamento de sementes sobre a penetração dos juvenis infectivos de *Heterodera glycines*.

O tratamento de sementes com produto a base de abametcina proporcionou supressão do número de indivíduos *Heterodera glycines* aos 21 dias da inoculação, demonstrando que o tratamento de sementes pode ser uma ferramenta adicional no manejo de *H. glycines* na cultura da soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEDO, J.R.; DROPKIN, V.H. Technique for obtaining eggs and juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.14, p.418-420, 1982.

ASMUS, G.L.; TELES, T.S. **Primeiro registro de nematoide de cisto da soja na região centro-sul de Mato Grosso do Sul**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 4p. (Comunicado Técnico, 170).

BIRD JR., D. W.; KIRPATRICK, J.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v.15, p.142-143, 1983.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Acompanhamento safra brasileira de grãos**, v. 1 - Safra 2013/14, n. 8 - Oitavo Levantamento, Brasília, maio 2014. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_08_10_11_00_boletim_graos_maio_2014.pdf>. Acesso em: Maio. 2014.

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

ESPINDOLA, D.L.P.; OLIVEIRA, W.H. **Tratamento de sementes de soja e parasitismo por *Meloidogyne javanica***. 2013.29 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados. MS.

FERRAZ, S.; DIAS, C.R. & FREITAS, L.G. de. Controle de Nematoides com práticas culturais. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo Integrado Fitossanidade: Cultivo Protegido, Pivô Central e Plantio Direto, Viçosa**, ed. Suprema, p.1-51, 2001.

GOLINOWSKI, W; GRUNDLER, F.M.W.; SOBCZAK, M. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. **Protoplasma**, Viena. vol. 194, n. 1-2, p. 103-116, 1996.

LAURITIS, J.A.; REBOIS, R.V.; GRANEY, I.S. Development of *Heterodera glycines* Ichinohe on soybean, *Glycine max* (L.) Merr., under gnotobiotic conditions. **Journal of Nematology**, Lawrence. vol. 15, n. 2, p.272-281, 1983.

LOVATO, B. V.; NASCIMENTO JUNIOR, A. C.; BUZZERIO, N. F.; MARTINHO, L. Avaliação da eficiência do nematicida Avicta®500 FS para controle de *Meloidogyne incognita* em diferentes cultivares de algodoeiro *Gossypium hirsutum* através do tratamento de sementes. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Anais...** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2007a. 1 CD-ROM.

LOVATO, B. V.; NASCIMENTO JUNIOR, A. C.; BUZZERIO, N. F.; MARTINHO, L. Eficiência do nematicida abamectina (Avicta®500 FS) para controle de *Rotylenchulus reniformis* em algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) através do tratamento de sementes. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Anais...** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2007b. 1 CD-ROM.

SCHIMITT, D.P.; WRATHER, J.A.; RIGGS, R.D. **Biology and management of soybean cyst nematode**. 2. ed. Schmitt, Marceline. 2004. 262p.

SCHUMANN, G.L.; D'ARCY, C.J. **Hungry Planet: Stories of Plant Diseases**. St. Paul: APS Press. 2012. 294p.

TYLKA, G.L. **Soybean cyst nematode**. Iowa State University Extension. Ames. Pm-879. 1995.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PORTO-PUGLIA, A.; RAM, H.H. & YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, St Paul, v.81, n.1, p.107-110, 1997.