

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

MARYANE FERREIRA DE MELO

**TRATAMENTO QUÍMICO DE SEMENTES DE SOJA COM PRODUTOS PARA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À *Meloidogyne incognita*.**

UBERLÂNDIA – MG

2018

MARYANE FERREIRA DE MELO

**TRATAMENTO QUÍMICO DE SEMENTES DE SOJA COM PRODUTOS PARA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À *Meloidogyne incognita*.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia, da
Universidade Federal de Uberlândia para
obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amelia dos Santos

UBERLÂNDIA – MG

2018

RESUMO

Avaliou-se o efeito no fator de reprodução de *Meloidogyne incognita* e indução de resistência através da atividade da quitinase nas raízes, com o tratamento químico em sementes de soja. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 14 tratamentos e 10 repetições, sendo a parte enzimática com e sem o nematoide. O experimento foi avaliado após 60 dias para fator de reprodução e para atividade enzimática três dias após a semeadura, totalizando cinco dias de coleta. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott à 0,05 de significância. Não houve interação significativa podendo tratar-se de uma cultivar resistente e na atividade enzimática foi observado uma resistência sistêmica adquirida em decorrência ao nematoide.

Palavras-chave: *Glycine max*, nematoide das galhas, quitinase.

ABSTRACT

The effect on the reproduction factor of *Meloidogyne incognita* and induction of resistance through chitinase activity in the roots was evaluated with the chemical treatment of soybean seeds. The experimental design was completely randomized (DIC), with 14 treatments and 10 replicates, being the enzymatic part with and without the nematoid. The experiment was evaluated after 60 days for reproduction factor and for enzymatic activity three days after sowing, totaling five days of collection. Data were submitted to the Scott-Knott test at 0.05 significance. There was no significant interaction and it could be a resistant cultivar and in the enzymatic activity a systemic resistance was observed as a result of the nematoid.

Keywords: *Glycine max*, gill nematode, chitinase.

INTRODUÇÃO

A produção nacional de soja conquistou recorde de 119,3 milhões de toneladas na safra 2017/18, superando 4,6% a safra passada. A cultura teve ganho da área semeada, passando de 33,91 para 35,14 milhões de hectare na safra 2017/18, um aumento de 1,23 milhão de hectares e um novo recorde na produtividade média de 3.394 kg.ha⁻¹. Os bons resultados dessa safra resultaram do uso de um bom pacote tecnológico, em associação a precipitações e temperaturas favoráveis, apesar de alguns problemas na Região Sul do país (Conab, 2018).

A alta produtividade na cultura da soja é limitada principalmente pelos problemas fitossanitários, evidenciando-se os nematoides. No Brasil, dentre os gêneros mais relevantes e de interesse econômico para a soja, destacam-se as espécies: *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid; White) Chitwood, causadora de galhas; *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey; Filipjev; Schuurmans Stekhoven), nematoide das lesões e *Heterodera glycines* Ichinohe, nematoide de cisto da soja (Almeida et al., 2005).

Com vasta distribuição geográfica e grande gama de hospedeiros, os nematoides formadores de galha, *Meloidogyne* sp., também causam grandes danos na cultura da soja (Sasser, 1979; Moens et al., 2009). O principal sintoma desse gênero é o aparecimento de galhas no sistema radicular, podendo ocasionar murcha das plantas durante os períodos quentes do dia (Tihohod, 2000).

Outros sintomas relacionados aos nematoides das galhas são: baixo desenvolvimento das plantas, ocasionando deformação; desfolha prematura; déficit mineral (sintomas); clorose; má-formação e subdesenvolvimento radicular; perda da eficiência do sistema radicular em transportar e absorver água e nutrientes, acarretando perda na produção, prejudicando ou até impedindo o cultivo no caso de infestações mais severas (Tihohod, 2000).

O manejo dos nematoides precisa ser planejado com a junção de diversos métodos de controle e de preferência baixo custo, recomenda-se frequentemente o uso de controle químico, controle biológico, plantio direto, variedades resistentes e rotação de culturas (Almeida et al., 2005).

Dentre as medidas de controle desses patógenos, o tratamento de sementes de soja com fungicidas é uma das mais econômicas e eficazes, pois além de erradicar o patógeno presente na semente, protegem as plântulas na fase inicial de desenvolvimento dos fitopatógenos presentes no solo (Goulart, 2000).

A indução de resistência tem sido outra forma apresentada em várias espécies de plantas contra o ataque de fungos, bactérias, vírus e nematoides. Destacam-se dentre os indutores a quitina, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta, formado por uma sequência linear de N-acetilglucosamina e a quitosana, forma desacetilada da quitina com poli D-glucosamina (Di Piero & Garda, 2008).

O crescimento da atividade enzimática de enzimas como quitinases na planta está relacionada com a indução de resistência. Além disso, a adição de quitina no solo gera um aumento na população de micro-organismos

quitinolíticos, causando a supressão de fungos e fitonematoides existentes no solo (Castro et al., 2011).

Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do tratamento químico de sementes de soja na redução de populações de *Meloidogyne incognita* e verificar o efeito na indução da resistência a partir das atividades de quitinases.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na casa de vegetação, no Laboratório de Nematologia (LANEM) e no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LABITOX) da Universidade Federal de Uberlândia do campus Umuarama, Uberlândia-MG, no período de fevereiro a julho de 2016.

Fator de reprodução (FR) dos nematoides

Foram utilizados vasos plásticos de 1,5 L⁻¹ contendo solo na proporção 2:1 (areia e solo), sendo semeadas cinco sementes de soja por vaso e realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. Primeiramente, foi feita a análise nematológica de solo, para evitar contaminação por fitonematoides nas parcelas. As sementes de soja foram fornecidas pela empresa Basf e já se encontravam tratadas com os respectivos produtos químicos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições (Tabela 1).

TABELA 01. Tratamento químico de sementes de soja para controle de *M. incognita*. Uberlândia, 2018.

Produto	Dose Comercial (mL.Kg ⁻¹ semente)
T1- Testemunha - sem tratamento	-
T2- Standak® Top	2,0
T3- BAS 451 AB I	5,0
T4- Avicta 500 FS	1,0
T5- Cis-jasmone	0,005
T6- Integral	1,0
T7- Integral	0,1
T8- ABU1419 A	1,5
T9- ABU1419 A	15,0
T10- ABU 1814	1,8
T11- ABU 1814	18,0
T12- Standak Top + Cis-jasmone + Integral	2,0 + 0,005 + 0,1
T13- Standak Top + Integral	2,0 + 0,1
T14- Standak Top + Cis-jasmone	2,0 + 0,005

A inoculação dos fitonematoides foi realizada com a abertura de três orifícios com 2 cm de profundidade e distanciados a 2 cm da haste da muda, onde foram distribuídos 10 mL⁻¹ da suspensão calibrada, contendo 5.000 ovos de *M. incognita*.

A análise dos tratamentos foi realizada após 60 dias após a inoculação. O solo contido nos vasos plásticos foi homogeneizado e retirado

uma alíquota de 150 mL⁻¹ e as raízes coletadas, para efetuar a extração dos nematoides. O processamento do solo e raízes foi feito por peneiramento e flotação centrífuga em solução de sacarose (Jenkins, 1964), e nas raízes depois de lavadas e pesadas, seguiu a técnica do liquidificador doméstico (Bonetti; Ferraz, 1981). Com a câmara de Peters foi realizada a contagem dos nematoides sob microscópio de luz, e feito o cálculo do Fator de Reprodução (FR), dividindo-se a população final pela população inicial (5000 ovos).

Atividade enzimática

Para análise da atividade enzimática foi realizado experimento paralelo, com a metodologia semelhante ao citado no item 2.1. Repetiu-se os tratamentos já citados (Tabela 1), e acrescentou tratamentos com os mesmos produtos porém sem a presença de *M. incognita*, conforme Tabela 2.

TABELA 02. Tratamento químico de sementes de soja para indução de resistência à *M. incognita*. Uberlândia, 2018.

Produto (Sem nematoide)	Dose Comercial (mL.Kg ⁻¹ semente)
T15- Testemunha absoluta- sem produto	
T16- Standak® Top	2,0
T17- BAS 451 AB I	5,0
T18- Avicta 500 FS	1,0
T19- Cis-jasmone	0,005
T20- Integral	1,0
T21- Integral	0,1
T22- ABU1419 A	1,5
T23- ABU1419 A	15,0
T24- ABU 1814	1,8
T25- ABU 1814	18,0
T26- Standak Top + Cis-jasmone + Integral	2,0 + 0,005 + 0,1
T27- Standak Top + Integral	2,0 + 0,1
T28- Standak Top + Cis-jasmone	2,0 + 0,005

Para esse experimento foram utilizados copos plásticos de 500 mL⁻¹ contendo o solo na proporção 2:1 (areia e solo). Para os tratamentos com nematoide a inoculação foi realizada antes da semeadura. Para tal ao solo de cada copo plástico foi adicionado 10 mL⁻¹ da suspensão calibrada com 5.000 ovos de *M. incognita*, e posteriormente homogeneizado antes de ser colocado no copo plástico. Em seguida, foi realizado a semeadura tanto nos vasos com nematoides como nos sem nematoides com as sementes quimicamente tratadas fornecidas pela empresa.

Para análises da atividade enzimática as plântulas foram coletadas 3, 4, 5, 6 e 7 dias após a semeadura (DAS). Para isso, eram coletadas diariamente duas amostras por tratamento, lavadas e conduzidas até o laboratório. Para análise eram utilizadas apenas as raízes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 14 x 5 (nematóide x produtos x DAS) com 10 repetições, totalizando 28 tratamentos.

No laboratório foi pesado 1 g de raízes para cada parcela, cortadas dentro do microtubo de 1,5 mL⁻¹ maceradas e homogeneizadas em 4mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz até obter um pó uniforme, sendo centrifugadas a 14.000g por 25 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a – 20°C. O produto dessa maceração foi submetido ao Kit de ensaio de Quitinase (Chitinase Assay Kit) da Sigma-Aldrich® com absorvância de 405 nm. O kit de ensaio para quitinase é baseado na hidrólise enzimática do substrato quitinase (β -N-acetilglucosaminidase), liberando p-nitrofenol (4-nitrofenol), que por ionização, em pH básico, pode ser medido colorimetricamente (Sigma-Aldrich, 2018). A atividade da quitinase foi determinada em termos equivalentes da enzima já conhecida de quitinase de *Trichoderma viride*, os resultados foram expressos em unidades de absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹. De cada amostra foram feitas triplicatas em microplacas de 96 poços e a quantificação da análise enzimática foi realizada em Leitor de Elisa.

Análise estatística

Os dados foram obtidos através do programa estatístico Sisvar® (Ferreira, 2000), realizando a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott à 0,05 de significância.

RESULTADOS

Fator de reprodução (FR) dos nematoides

Os resultados referentes ao Fator de Reprodução de *M. incognita* estão representados na Tabela 03 abaixo.

TABELA 03. Fator de reprodução de *M. incognita* em plantas de soja após tratamento químico de sementes. Uberlândia, 2018.

Tratamento	FR
T1- Testemunha - sem tratamento	0,64a
T2- Standak® Top	0,55a
T3- BAS 451 AB I	0,58a
T4- Avicta 500 FS	0,62a
T5- Cis-jasmone	0,61a
T6- Integral	0,71a
T7- Integral	0,63a
T8- ABU1419 A	0,51a
T9- ABU1419 A	0,66a
T10- ABU 1814	0,55a
T11- ABU 1814	0,75a
T12- Standak Top + Cis-jasmone + Integral	0,64a
T13- Standak Top + Integral	0,66a
T14- Standak Top + Cis-jasmone	0,64a

Médias seguidos por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 0,05 de significância.

Não foi observado redução do fator de reprodução em nenhum dos tratamentos em relação a testemunha.

Atividade enzimática

Não houve interação significativa entre os fatores produtos e nematoides. Por essa razão são apresentados dados separados, com e sem nematoide, não permitindo a comparação desses tratamentos.

Para atividade enzimática de quitinase nos tratamentos com inoculação de *M. incognita* foi observada interação significativa entre tratamentos e dias de avaliação. Os resultados encontram-se na Tabela 04.

TABELA 04. Análise da atividade enzimática da quitinase em plantas de soja com *M. incognita*. Uberlândia, 2018.

Tratamentos	3 DAS	4 DAS	5 DAS	6 DAS	7 DAS
T1	0,10aB	0,46aA	0,52aA	0,50aA	0,58bA
T2	0,10aB	0,18bB	0,37bA	0,41bA	0,48bA
T3	0,03bB	0,34aA	0,54aA	0,43bA	0,51bA
T4	0,14aC	0,22bC	0,25bC	0,54aA	0,37cB
T5	0,03bC	0,36aB	0,54aA	0,55aA	0,57bA
T6	0,01bC	0,27bB	0,35bB	0,51aA	0,43cA
T7	0,14aB	0,17bB	0,55aA	0,42bA	0,53bA
T8	0,02bD	0,36aC	0,31bC	0,57aB	0,76aA
T9	0,07bB	0,23bB	0,46aA	0,42bA	0,58bA
T10	0,06bB	0,44aA	0,34bA	0,40bA	0,55bA
T11	0,04bB	0,21bB	0,48aA	0,44bA	0,58bA
T12	0,07bD	0,32aC	0,35bC	0,56aB	0,84aA
T13	0,07bD	0,33aB	0,53aA	0,13cC	0,07dD
T14	0,13aB	0,25bB	0,38bA	0,38bA	0,40cA

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 0,05 de significância.

Analisando por dia após a semeadura, aos 3 DAS os tratamentos T1-Testemunha inoculada, T2-Standak Top, T4-Avicta 500 FS, T7- Integral (0,1 mL.Kg⁻¹ semente) e T14 - Standak Top/Cis-jasmone obtiveram melhores resultados com relação aos demais, com maior atividade enzimática. Aos 4 DAS os tratamentos que se destacaram foram T1-Testemunha inoculada, T3 - BAS 451 AB I, T5 - Cis-jasmone, T8 - ABU1419 A (1,5 mL.Kg⁻¹ semente), T10 - ABU 1814 (1,8 mL.Kg⁻¹ semente), T12 - Standak Top/Cis-jasmone/Integral, T13 -Standak Top/Integral e T14 - Standak Top/Cis-jasmone. Aos 5 DAS os melhores tratamentos T1 – Testemunha inoculada, T3 - BAS 451 AB I, T5 - Cis-jasmone, T7- Integral (0,1 mL.Kg⁻¹ semente), T9 - ABU1419 A (15,0 mL.Kg⁻¹ semente), T11- ABU 1814 (18,0 mL.Kg⁻¹ semente), T13 -Standak Top/Integral e T14 - Standak Top/Cis-jasmone. Aos 6 DAS os produtos mais relevantes foram T1 – Testemunha inoculada, T4 - Avicta 500 FS, T5 - Cis-jasmone, T6 – Integral (1,0 mL.Kg⁻¹ semente), T8 - ABU1419 A (1,5 mL.Kg⁻¹ semente) e T12 - Standak Top/Cis-jasmone/Integral. Por fim aos 7 DAS os tratamentos T8 - ABU1419 A (1,5 mL.Kg⁻¹ semente) e T12 - Standak Top/Cis-jasmone/Integral se destacaram.

Analisando cada produto, na maioria a atividade enzimática aumentou no decorrer de 3, 4 e 5 DAS mantendo-se constante até a última avaliação, exceto em Avicta 500 FS (T4) e Standak Top/Integral (T3) em que a atividade enzimática começou com aumento depois teve queda.

A avaliação da atividade enzimática de quitinase sem inoculação de *M. incognita* está descrita na Tabela 05. Foi observada interação significativa entre tratamentos e dias de avaliação.

TABELA 05. Análise da atividade enzimática da quitinase em plantas de soja sem nematoide. Uberlândia, 2018.

Tratamentos	3 DAS	4 DAS	5 DAS	6 DAS	7 DAS
T15	0,03bC	0,51aA	0,28bB	0,52aA	0,57bA
T16	0,02bC	0,36bB	0,52aA	0,56aA	0,44cB
T17	0,01bC	0,22cB	0,52aA	0,45aA	0,45cA
T18	0,08aB	0,24cB	0,38bA	0,38aA	0,44cA
T19	0,00bC	0,24cB	0,45aA	0,43aA	0,45cA
T20	0,01bB	0,21cA	0,38bA	0,37aA	0,30dA
T21	0,02bD	0,28cC	0,50aA	0,29aC	0,36dB
T22	0,05aC	0,29cB	0,51aA	0,37aB	0,40cB
T23	0,02bD	0,26cC	0,45aB	0,39aB	0,69aA
T24	0,03bC	0,32bB	0,32bB	0,46aA	0,37dB
T25	0,06aD	0,25cC	0,51aA	0,40aB	0,45cB
T26	0,02bD	0,25cB	0,32bB	0,41aA	0,13eC
T27	0,02bD	0,17cC	0,49aA	0,29aB	0,31dB
T28	0,07aB	0,34bA	0,48aA	0,36aA	0,32dA

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 0,05 de significância.

A análise dos tratamentos por dia após a semeadura, aos 3 DAS poucos tratamentos obtiveram aumento da atividade enzimática, destacando T18 - Avicta 500 FS, T22 - ABU1419 A (1,5 mL.Kg⁻¹ semente), T25- ABU 1814 (18,0 mL.Kg⁻¹ semente) e T28 - Standak Top/Cis-jasmone. Aos 4 DAS destacaram-se T15 -Testemunha não inoculada. Aos 5 DAS os melhores

resultados foram T16 - Standak Top, T17- BAS 451 AB I, T19 - Cis-jasmone, T21- Integral (0,1 mL.Kg⁻¹ semente), T22 - ABU1419 A (1,5 mL.Kg⁻¹ semente), T23 - ABU1419 A (15,0 mL.Kg⁻¹ semente), T25- ABU 1814 (18,0 mL.Kg⁻¹ semente), T27 -Standak Top/Integral e T28 - Standak Top/Cis-jasmone. Aos 6 DAS não houve diferença significativa entre produtos. Aos 7 DAS destacou-se T23 - ABU1419 A (15,0 mL.kg⁻¹ semente).

Analisando os produtos, na maioria dos tratamentos foi observado um pico em um dos dias com posterior queda da atividade enzimática, com exceção de T17- BAS 451 AB I, T18 - Avicta 500 FS, T19 - Cis-jasmone, T20 – Integral (1,0 mL.Kg⁻¹ semente) e T28 - Standak Top/Cis-jasmone que após aumento da atividade enzimática se manteve constante.

DISCUSSÃO

Observando as análises da atividade enzimática da quitinase em plantas de soja com nematoide (Tabela 04) a testemunha inoculada (T1) esteve entre os melhores resultados todos os dias exceto aos 7 DAS, ou seja uma maior atividade enzimática com relação a outros tratamentos. Dessa forma provavelmente trata-se de uma cultivar resistente.

A baixa atividade enzimática da testemunha não inoculada (T15) (TABELA 05) justifica a hipótese de que o ataque do nematoide leva ao aumento da atividade enzimática da enzima, com indução de resistência sistêmica adquirida, visto que esse comportamento dos tratamentos em relação à testemunha inoculada não foi observado na Tabela 04.

A indução de resistência pode ser desencadeada através de inoculação de micro-organismos não patogênicos, por via de inoculações de

patógenos restritos, por plantas com genes de resistência escassos e através de compostos químicos (Kessman et al., 1994).

A síntese e acúmulo de β -1, 3-glucanases e quitinases apresentou aumento após plântulas de soja serem contaminadas com *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (Yi & Hwang, 1996).

Com relação ao fator de reprodução (Tabela 03) os tratamentos obtiveram o mesmo resultado que a testemunha evidenciando que a cultivar era resistente. Além disso, os resultados positivos da testemunha inoculada na atividade enzimática da quitinase (Tabela 04) também justifica essa hipótese.

Dentre os produtos utilizados, o fungicida/inseticida Standak® Top é classificado como indutor de resistência, porém neste trabalho não demonstrou esse comportamento. Provavelmente esse produto utiliza de outra rota bioquímica diferente da quitinase para indução de resistência a fitopatógenos.

Conclui-se que nenhum dos produtos reduziu o fator de reprodução de *M. incognita* por tratar-se de uma cultivar resistente e também não aumentaram a atividade de quitinase, sendo observado resistência sistêmica adquirida nas raízes de soja em decorrência da infecção do patógeno.

REFERÊNCIAS

- Almeida AMR, Ferreira LP, Yorinori JT, Silva JFV, Henning AA, Godoy CV, Costamilan LM, Meyer MC (2005) Doenças da Soja. Em: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Eds.) Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo, Brasil. p. 569-588.
- Bonetti JIS, Ferraz S (1981) Modificações do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6: 553.
- Castro L, Flores L, Uribe L (2011) Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* em tomate a nível de invernadero. Agronomía Costarricense 35: 21-32.
- CONAB. Soja, safra 2017-2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos?limitstart=0>. Acessado em 16 de dezembro de 2018.
- Di Piero ORM, Garda MV (2008) Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. Pesquisa agropecuária brasileira Brasília 43: 1121-1128.
- Goulart ACP, Melo Filho GA (2000) Quanto custa tratar as sementes de soja, milho e algodoeiro com fungicidas? Embrapa Agropecuária Oeste. Boletim de Pesquisa no. 7.
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, St. Paul 48: 692.
- Moens MM, Roland NP, Starr JL (2009) A Diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds) Root-knot nematodes. Texas, United States of America. CAB International. p.1-17.
- Monteiro AR, Moraes SRAC (1992) Ocorrência do nematoide de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura no Mato Grosso do Sul. Nematologia Brasileira 16: 101.
- Sasser JN, Carter CC (1985) Na advanced treatise on *Meloidogyne*. North Carolina State University Graphics, USA 1: 225-231.
- SIGMA ALDRICH. Chitinase Assay Kit. Disponível em: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cs0980?lang=pt®ion=BR. Acessado em 16 de dezembro de 2018.
- Tihohod D (2000) Nematologia Agrícola Aplicada. 2a ed. Jaboticabal, Brasil. Funep.