

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

**CICLO DE VIDA DO NEMATÓIDE DE GALHA (*Meloidogyne incognita*) NUMA
CULTIVAR DE SOJA SUSCETÍVEL**

ORLANDO ALVES DE FREITAS JÚNIOR

MARIA AMELIA DOS SANTOS
(Orientadora)

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Uberlândia-MG
Julho-2003

**CICLO DE VIDA DO NEMATÓIDE DE GALHA (*Meloidogyne incognita*) NUMA
CULTIVAR DE SOJA SUSCETÍVEL**

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 21 / 07 / 2003

Prof. Dr. Maria Amelia dos Santos
(Orientadora)

Prof. Dr. Ednaldo Carvalho Guimarães
(Membro da Banca)

Prof. Dr. Osvaldo Toshiyuki Hamawaki
(Membro da Banca)

Uberlândia – MG
Julho- 2003

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Obtenção e multiplicação do inóculo.....	10
3.2. Instalação, condução e avaliação do experimento.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5. CONCLUSÕES.....	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

RESUMO

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, MG, no período de 18 de fevereiro a 16 de abril de 2003. Objetivou-se estudar o ciclo de vida do fitonematóide *Meloidogyne incognita* na cultivar de soja suscetível 'Pintado'. Para tanto, 50 vasos com capacidade para 1,5 L contendo a mistura de terra:areia na proporção 1:2, respectivamente, tratada com brometo de metila, receberam uma plântula de soja em cada um. A soja havia sido semeada em bandejas de isopor contendo substrato agrícola. Após 5 dias do transplântio, realizou-se a inoculação de 4.000 ovos do fitonematóide contidos em uma suspensão de 10 mL. Essa suspensão foi distribuída em três orifícios feitos no solo ao redor da haste da plântula e com uma profundidade de 2 cm. Após a inoculação, em intervalos de 5 em 5 dias foram feitas as avaliações que totalizaram dez. Em cada avaliação, foram separados cinco vasos que constituíram as repetições. A parte aérea foi cortada rente ao solo e descartada. O vaso foi vertido em uma bandeja onde o solo foi separado do sistema radicular. O solo foi homogeneizado e uma alíquota de 150 cm³ foi retirada para o processamento pela técnica da flutuação centrífuga em solução de sacarose. A suspensão resultante foi observada em câmara de contagem e determinou-se o número de ovos e de juvenis de 2º estágio no solo. O sistema radicular foi submetido à técnica de coloração de nematóides em tecidos vegetais. Após a coloração, os fragmentos de raízes foram colocados em lâminas microscópicas e realizou-se a contagem de nematóides no interior das raízes assim como a determinação da fase do ciclo de vida que se encontravam. Na avaliação aos 50 dias, além desses procedimentos, foi realizado o processamento do sistema radicular pela técnica de

Boneti e Ferraz (1981) para extração de ovos e determinação do potencial reprodutivo de cada fêmea. O fator de reprodução foi determinado pela razão entre a população final (ovos por sistema radicular) e população inicial (4.000 ovos). Observou-se uma alta taxa de penetração de juvenis de 2º estágio nas raízes da soja logo na primeira avaliação. O desenvolvimento das fases juvenis foi normal e a partir do 20º dia após a inoculação já havia fêmeas. As fêmeas apresentaram potencial reprodutivo de 1254 ovos por fêmea. O fator de reprodução apresentado foi de 65,85, muito superior a 1,0 mostrando que a cultivar comportou-se como boa hospedeira, ou seja, suscetível ao fitonematóide.

1-INTRODUÇÃO

Os nematóides fitoparasitos constituem um dos principais problemas para a cultura da soja. Perdas de produção induzidas por esses organismos variam de leves a 100%. Segundo Antônio, H.& Dall’Agnoll, A. (1985), o cultivo de soja em área altamente infestada por *Meloidogyne incognita*_raça 4 resultou em 55,6% de redução na produção.

Os nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp., constituem um dos grupos de fitonematóides mais importantes para soja no Brasil. Sua ampla distribuição geográfica, polifagia e variabilidade fisiológica dificulta o estabelecimento de controle, especialmente a rotação de culturas e resistência varietal, consideradas as estratégias mais viáveis e eficientes.

A avaliação de genótipos de soja visando a identificação de fontes de resistências aos nematóides de galhas tem sido uma atividade constante. Por outro lado, o conhecimento da taxa de multiplicação de cultivares suscetíveis é muito importante. No momento do esquema de rotação que exige a volta do material suscetível, a colocação de material com taxa menor de multiplicação é interessante.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o ciclo de vida de *Meloidogyne incognita* em uma cultivar de soja suscetível e estabelecer sua taxa de multiplicação do nematóide.

2-REVISÃO DE LITERATURA

O ciclo de vida de *Meloidogyne* inicia-se com um ovo, normalmente no estágio unicelular, depositado pela fêmea que está no interior da raiz da planta hospedeira. Os ovos são depositados numa matriz gelatinosa que os protege, formando uma massa de ovos. Mais de 1000 ovos podem ser encontrados em uma massa que pode chegar a ter o tamanho do corpo da fêmea. O desenvolvimento do ovo inicia-se dentro de poucas horas depois da deposição, resultando em 2, 4, 8 e mais células, até a total formação do juvenil no seu interior. Este é o chamado primeiro estágio juvenil ou J₁ (Tihohod,1993).

A primeira ecdise ocorre no interior do ovo, formando o J₂ que eclode, emergindo de um orifício feito na parede da casca do ovo por meio de repetidas estocadas do estilete. Este juvenil pode ou não deixar a massa imediatamente. Normalmente encontram-se na massa de ovos, vários juvenis recém-eclodidos, juntamente com ovos em vários estádios de desenvolvimento (Tihohod, 1993).

Depois de deixar a massa de ovos, que pode estar fora da raiz ou mesmo no seu interior, J₂ move-se no solo à procura da raiz onde irá se alimentar. A procura parece ser ao

acaso, e o juvenil é guiado por muitas substâncias exsudadas das raízes do hospedeiro (Tihohod, 1993). O J₂ penetra na raiz, normalmente próximo a capa protetora na raiz. Ele move-se entre as células indiferenciadas, parando com a cabeça próximo à região de alongação celular no córtex.

A parede celular é então puncionada com o estilete, injetando secreções das glândulas esofagianas que causam alargamento das células no cilindro vascular, aumentando as taxas de divisão celular no periciclo. Isso leva a formação das chamadas “células gigantes”, células nutridoras ou sincício, formadas pelo aumento das células (**hipertrofia**), com a dissolução das paredes celulares, aumento do núcleo e mudanças na composição dos conteúdos celulares.

Ao mesmo tempo há uma intensa multiplicação celular (**hiperplasia**) em torno da parte anterior do corpo do juvenil. Estas mudanças são acompanhadas normalmente, mas não invariável pelo alargamento das raízes, formando distintas galhas.

Enquanto as células nutridoras e galhas estão se formando, a largura do juvenil aumenta, e as células do primórdio genital se dividem, tornando-se distintas. O juvenil sofre uma série de transformações que culminam nas ecdises, dando origem aos J₃, J₄ e finalmente aos adultos que podem ser macho ou fêmea (Tihohod, 1993).

Inúmeros estudos revelam que a duração do ciclo vital de espécies de *Meloidogyne* é extremamente variável, dependendo do parasito, da planta hospedeira e de fatores ambientes, principalmente a temperatura (Tihohod, 1993). O ciclo de vida de *Meloidogyne* em bananeira e videira, de ovo a ovo, leva aproximadamente 25 a 30 dias, respectivamente, à temperatura de 27 °C. Em fumo, pode completar em menos de 20 dias, com temperatura variando entre 25 e 30 °C. Em climas quentes, os nematóides se multiplicam a uma taxa de

5 a 10 gerações por ano e são muito mais ativos para acharem e atacarem as plantas que os das regiões frias.

No início da década de oitenta, por cinco anos consecutivos, Antonio & Dall’Agnol (1985) avaliaram a reação aos nematóides *M. incognita* e *M. javanica*, das cultivares de soja indicadas para o Brasil. Apenas as cultivares OCEPAR 4- Iguçu, OCEPAR 3- Primavera, Tropical, BR-6 (Nova Bragg) e Bragg se mostraram resistentes às duas espécies. Estudos posteriores mostraram que OCEPAR 3- Primavera não era resistente. Portanto, entre aproximadamente 115 cultivares indicadas para o país no período, somente 3,5 % possuíam resistência.

Nos últimos anos, em decorrência dos maiores prejuízos causados pelos nematóides formadores de galhas, alguns programas de melhoramento, entre eles o da Embrapa Soja e seus parceiros, passaram a dar maior ênfase à resistência a esses nematóides. Em 1997, Dias et al. (1999) avaliaram 130 genótipos de soja procedentes dos programas de melhoramento genético da Embrapa Soja e da COODETEC, concluindo que as cultivares MS/BR-19 (Pequi), MG/BR-46 (Conquista), Tropical, BRSMG Renascença, BRSMG 68 (Vencedora), BRSMG Garantia, CD201, CD203 e OCEPAR 4-Iguçu, eram resistentes ou moderadamente resistentes às duas espécies. Outras 71 linhagens, apresentaram resistência à *M. javanica* e/ou *M. incognita*.

As cultivares de soja Pintado, Matrinchã, Piraíba, Tucunaré, Caxara são suscetíveis aos nematóides de galhas, embora sejam resistentes ao nematóide de cisto da soja.

3-MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido na casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, no período de 18 de fevereiro a 16 de abril de 2003.

3.1-Obtenção e multiplicação do inóculo

O inóculo utilizado foi obtido pela extração de ovos de *M. incognita* pela técnica de Boneti e Ferraz (1981), a partir de raízes de tomateiro infectadas.

As raízes galhadas foram picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2cm. Esses pedaços foram colocados em liquidificador contendo solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. A trituração ocorreu por 20 s na menor rotação do liquidificador. A suspensão obtida foi vertida na peneira de 200 sobreposta à peneira de 500 mesh. O resíduo da peneira de 500 mesh foi recolhido e a suspensão obtida contendo ovos do nematóide calibrada para conter 400 ovos/mL.

3.2-Instalação, condução e avaliação do experimento

Realizou-se a semeadura de soja no dia 18 de fevereiro de 2003 em uma bandeja de isopor contendo substrato agrícola tipo Plantmax. Foi semeada uma semente por célula e após 7 dias realizou-se o transplântio das plântulas para os vasos plásticos com capacidade de 1,5 L contendo mistura de terra:areia na proporção de 1:2 e tratada com brometo de metila.

Após 12 dias da semeadura, realizou a inoculação do nematóide. Foram aplicados 10 mL da suspensão de ovos, totalizando 4.000 ovos por vaso. Essa suspensão foi aplicada em três orifícios ao redor da haste da plântula a uma profundidade de 2 cm e distanciados de 2 cm do caule.

Durante o experimento, ocorreram 10 avaliações com intervalos de 5 dias após o dia da inoculação. Em cada avaliação, foram coletadas cinco repetições (cinco vasos). As amostras de solo foram processadas pela técnica de flutuação centrífuga em solução de sacarose (Jenkins, 1964). As raízes foram processadas pela técnica de coloração de tecidos vegetais para detecção de nematóides (Byrd et al, 1983).

O solo de cada vaso foi homogeneizado e uma alíquota de 150 cm³ recolhida e adicionada em um recipiente, que recebeu um volume aproximado de 1,5 L de água. Os torrões foram desmanchados para liberar os nematóides na suspensão. Agitou-se e deixou-se em repouso por 15 s. Esta suspensão, passou por uma peneira de 20 mesh a fim de reter os resíduos grosseiros presentes no solo e pela peneira de 400 mesh. Com o auxílio de jatos de água de uma piseta, recolheu-se o resíduo da peneira de 400 mesh para um copo de béquer.

A suspensão foi colocada em tubos de centrífuga, que após balanceados, foram centrifugados por 5 min, a uma velocidade de 650 gravidades. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao resíduo adicionou-se solução de sacarose e nova centrifugação ocorreu por 1 min na mesma velocidade. Após esse período, o sobrenadante foi vertido em uma peneira de 500 mesh na posição inclinada, deixando cair jato de água leve para tirar o excesso solução de sacarose. O resíduo dessa peneira, com auxílio de jatos de água de uma piseta, passou para um copo. A suspensão final foi utilizada para determinação do número de ovos no solo com auxílio da câmara de contagem de Peters.

As raízes de cada vaso foram submetidas à técnica de coloração. As raízes foram bem lavadas, retirando-se todo o solo, sem danificá-las. As raízes foram cortadas em pedaços de 1 a 2 cm e colocados em um béquer contendo 50 mL de água de torneira. Vinte mL de água sanitária comercial foram adicionados aos 50 mL de água, o que resultou em uma concentração final de 1,5% de NaOCl. Os fragmentos permaneceram por 4 min nessa solução, agitando-se ocasionalmente. As raízes foram retiradas e lavadas em água corrente por 30 a 45 s para retirar resíduos de NaOCl, passando o conteúdo do béquer por uma peneira plástica de chá e deixando a água corrente passar pelas raízes na peneira durante a lavagem. Após a lavagem, os pedaços de raízes permaneceram em um béquer com água de torneira durante 15 min. A água foi drenada e as raízes foram transferidas para um béquer contendo 30 mL de água + 1 mL do corante (composição do corante: 3,5g de fucsina ácida, 250 mL de ácido acético e 750 mL de água destilada). Aqueceu-se até fervura, e contou o tempo de 30 s a partir do início do ponto de fervura. O béquer foi retirado da chapa de aquecimento e ficou à temperatura ambiente para esfriar. O excesso de corante foi removido por lavagem em água corrente. As raízes foram colocadas em 20 a 30 mL de

glicerina. Para contagem dos nematóides no interior do tecido radicular, os fragmentos de raízes foram colocados em lâminas microscópicas e sobrepostas com lâminas microscópicas. As lâminas foram visualizadas no microscópio ótico e os nematóides coloridos contados e também identificados quanto à fase de desenvolvimento.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela Tabela 1 e pelo Gráfico 1 verifica-se que houve eclosão dos juvenis de 2º estágio de quase toda totalidade dos ovos inoculados, apenas 1% não desencadearam o processo de embriogênese e não tornaram-se juvenis de 2º estágio para penetrar e iniciar a infecção.

TABELA 1 - Número de ovos recuperados no solo do vaso a cada intervalo de 5 dias após a inoculação de 4.000 ovos de *Meloidogyne incognita* em soja 'Pintado'. UFU, Uberlândia, MG, 2003.

Dias após a inoculação	Número de ovos
5	44,4 (3,847)*
10	26,4 (2,607)*
15	16,8 (3,633)*
20	10,0 (3,714)*
25	9,2 (2,190)*
30	1 (1)*
35	4 (2)*
40	17,2 (4,816)*
45	22,8 (2,28)*
50	42,4 (11,02)

* Médias de cinco repetições com o respectivo desvio padrão entre parênteses.

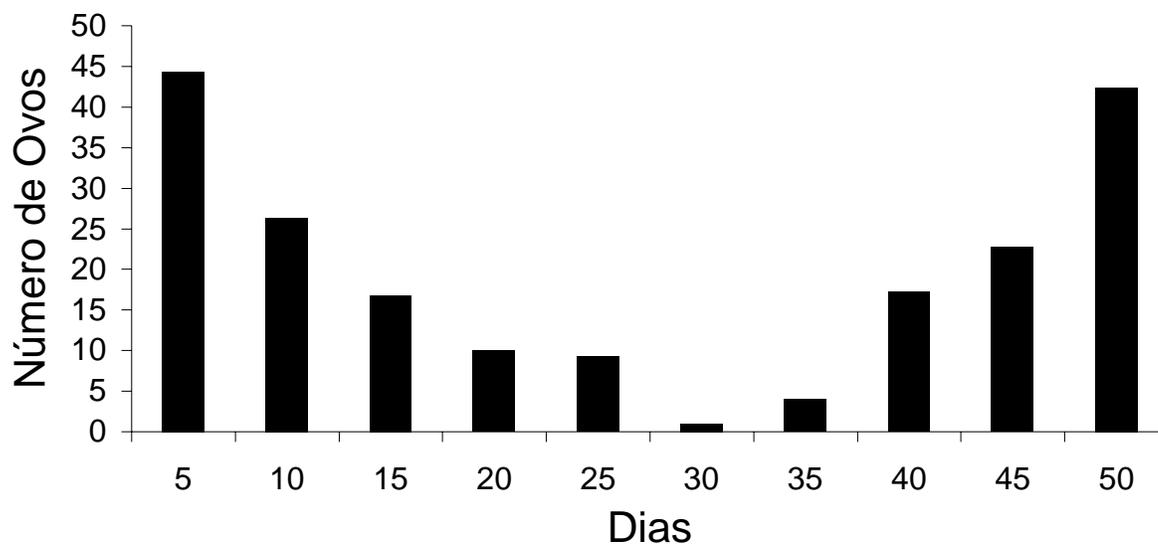


GRÁFICO 1 Número de ovos de *Meloidogyne incognita* recuperados do solo de cada vaso em intervalos de 5 dias após a inoculação com 4.000 ovos.

O comportamento da população do nematóide no interior dos tecidos das raízes pode ser observado na Tabela 2 e no Gráfico 2. Dos quase 4.950 ovos disponíveis no solo que poderiam iniciar a penetração e posterior processo de infecção, foram verificados após 5 dias da inoculação 97,4 nematóides no interior da raiz. Essa alta taxa de penetração, possivelmente pode ser pela atuação de um mecanismo de substâncias atrativas presentes no exsudato radicular da soja. Os nematóides que penetraram estabeleceram o local especial de alimentação, pois na segunda avaliação, o J₂ já apresentou modificação na forma passando de vermiforme para a forma de salsicha. Na terceira avaliação, encontrava-se J₂ e J₃. Já nas seguintes, observava-se os estádios J₃, J₄ e o adulto (fêmea). A quantidade de ovos por fêmea observada nas avaliações de 35 a 50 dias, mostra um alto potencial reprodutivo. Isto pode ser devido a condições nutricionais ou funcionais das

células gigantes que permitiram a formação de todos os ovos. As fêmeas apresentaram potencial reprodutivo de 1254 ovos por fêmea. O fator de reprodução apresentado foi de 65,85 , muito superior a 1,0 mostrando que a cultivar comporta-se como boa hospedeira, ou seja suscetível ao fitonematóide.

TABELA 2 – Número de nematóides em suas fases respectivas do ciclo de vida de *Meloidogyne incognita* em raiz de soja ‘PINTADO’ em intervalos de 5 dias após a inoculação de 4.000 ovos. UFU, Uberlândia, MG, 2003.

DIAS	J2	J3	J4	Fêmea
5	97,4 (21,617)*			
10	101,0 (8,154)*			
15	85,2 (7,782)*	120,8 (22,928)*		
20		199,6 (26,8)*	38,6 (3,647)*	59,8 (8,58)*
25		36,6 (14,89)*	39,0 (10,14)*	114,0 (16,18)*
30		22,0 (3,39)*	29,0 (4,898)*	33,6 (6,46)*
35		41,0 (2,738)*	50,0 (5,916)*	143 (16,613)*
40			39 (4,949)*	189 (5,656)*
45				194 (9,433)*
50	147 (88,49)*			198 (12,942)*

- Médias de cinco repetições com seu respectivo desvio padrão entre parênteses.

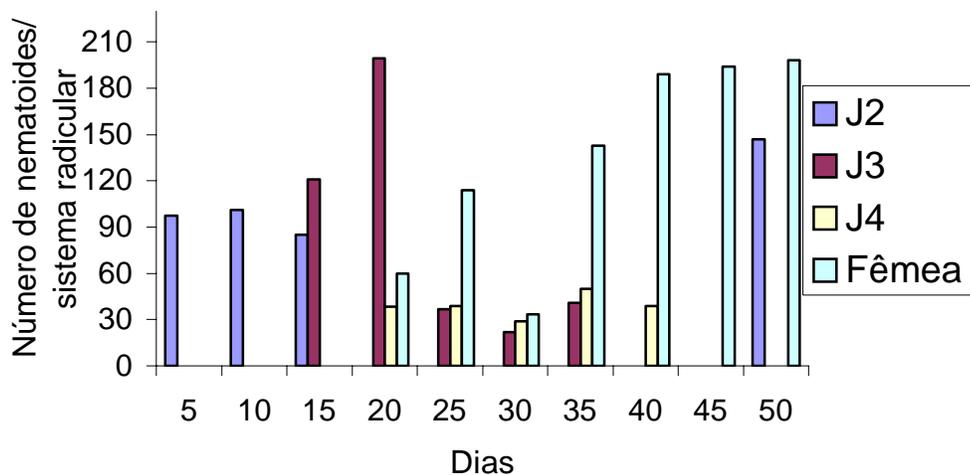


GRÁFICO 2 – Número de nematóides em suas fases respectivas do ciclo de vida de *Meloidogyne incognita* em raiz de soja ‘Pintado’ em intervalos de 5 dias após a inoculação de 4.000 ovos.

5-CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que a cultivar de soja 'Pintado' é suscetível ao fitonematóide *Meloidogyne incognita*, em que fêmeas apresentaram potencial reprodutivo de 1254 ovos e fator de reprodução de 65,85.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIO. & DALL'AGNOLL, A. **Nematóide das galhas; reação das cultivares brasileiras de soja.** EMBRAPA-CNPSO, 1985. 4P. (EMBRAPA.CNPSO. Comunicado técnico, 35

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.553, 1981.

BYRD, D. W.; T KIRKPATRYCK & K. R. BARKER. Na improved technic for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, 15 (1): 142-143. 1983.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter** 48:692. 1964.

DIAS, W.P.; GARCIA, A. PEREIRA, J. E. Levantamento, identificação e controle de nematóides formadores de galhas em soja. In: Embrapa Soja (Londrina,PR) . **Resultados de pesquisas da EmbrapaSoja 1998.** Londrina, 1999, p.18-21. (Embrapa Soja. Documentos, 125)

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada.** Jaboticabal: FUNEP, p.371, 1993.

