



## Viabilidade e sobrevivência do inóculo de *Heterodera glycines* raça 3 no solo

Edson H. Mizobutsi\*, Silamar Ferraz, Eduardo S.G. Mizubuti, Claudia R. Dias-Arieira# & Regina C.F. Ribeiro\*

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brasil

Autor para correspondência: Edson H. Mizobutsi, e-mail: edson.mizobutsi@unimontes.br

### RESUMO

Hospedeiros alternativos de fitonematóides podem causar restrição nutricional e afetar a capacidade de infecção e fertilidade dos nematóides. Nesse trabalho, avaliou-se o efeito da planta hospedeira na viabilidade do inóculo de *H. glycines* raça 3 e a sobrevivência desse inóculo no solo. O nematóide foi multiplicado em feijoeiro resistente (linhagem L2300), suscetível (cv. Ouro) e soja suscetível (cv. FT-Cristalina), e as suspensões de ovos foram preparadas a partir de fêmeas coletadas nesses hospedeiros. Para avaliar a penetração dos juvenis de segundo estágio e o desenvolvimento do nematóide até a fase adulta, suspensões de 2000 ovos foram colocadas em plantas de soja 'FT-Cristalina' (planta teste). Aos 10 dias após a inoculação, avaliou-se o número de juvenis que penetraram nas raízes. O número de fêmeas por sistema radicular foi avaliado aos 30 dias. O inóculo obtido a partir da linhagem L2300 resultou no menor número de juvenis e de fêmeas no interior das raízes da planta teste. O inóculo obtido na soja foi o que resultou na maior penetração e desenvolvimento do nematóide. Para avaliar a sobrevivência do inóculo, cistos de *H. glycines* produzidos nos diferentes hospedeiros permaneceram no solo, sem planta, por 18 meses. O menor percentual de ovos que sobreviveram no solo foi originário de cistos multiplicados em feijoeiro, da linhagem L2300 ou cv. Ouro. Conclui-se que o inóculo de *H. glycines* produzido em feijoeiro, resistente ou suscetível, apresenta menor viabilidade e sobrevivência no solo.

**Palavras-chave:** *Heterodera glycines*, cistos, feijão, inóculo, soja.

### ABSTRACT

#### Inoculum viability and survival of *Heterodera glycines* race 3 in soil

Alternative hosts of phytonematodes can cause nutritional restriction and affect infectivity and fertility of the nematode. In this study, we evaluated the effect of the host plant on inoculum viability of *Heterodera glycines* race 3 and survival of this inoculum in soil. The nematode was multiplied in resistant (line L2300) and susceptible (cv. Ouro) beans and susceptible soybeans (cv. FT-Cristalina), and the egg suspensions were prepared from females collected on these hosts. To evaluate penetration of second stage juveniles and development of the nematode to the adult phase, suspensions of 2,000 eggs were placed in soybean 'FT-Cristalina' plants (test plant). At ten days after inoculation, we evaluated the number of juveniles that penetrated the roots. The number of females per root system was evaluated at 30 days. The inoculum obtained from line L2300 resulted in fewer juveniles and females inside the roots of the test plant. The inoculum obtained from soybean resulted in higher penetration and development of the nematode. To evaluate the survival of the inoculum, cysts of *H. glycines* produced in the different hosts remained in the soil, without plants, for 18 months. The lower percentage of eggs that survived in the soil was originated from cysts multiplied in beans, line L2300 or cv. Ouro. It can be concluded that the inoculum of *H. glycines* produced in bean plants, resistant or susceptible, has lower viability and survival in the soil.

**Key words:** *Heterodera glycines*, beans, cysts, inoculum, soybeans.

Estudos relativos a gama de hospedeiros de *H. glycines* indicam que as espécies de *Phaseolus* apresentam suscetibilidade variável (Riggs & Hambleton, 1962), mas poucas são aquelas consideradas resistentes. No Brasil, dentre os 57 materiais de feijoeiro testados por Becker & Ferraz (2000), apenas quatro comportaram-se como moderadamente resistentes, destacando-se a linhagem L-2300. Mesmo as cultivares resistentes comportaram-

se como eficientes hospedeiros quando submetidos a diferentes populações do nematóide (Abawi & Jacobsen, 1981). A resistência da linhagem de feijoeiro L2300 a *H. glycines* parece estar ligada às condições nutricionais, dado ao menor desenvolvimento do sincício, que atuaria sobre os estádios finais de desenvolvimento, com maior impacto sobre as fêmeas (Becker et al., 1999). Em 1992, Halbrendt et al. elaboraram a hipótese da presença deste mecanismo de resistência, ao encontrarem menor número e tamanho de fêmeas em cultivares de soja resistentes em comparação com a soja suscetível. O desenvolvimento do nematóide é dependente do metabolismo da planta e da quantidade de nutrientes disponível no sítio de alimentação o que

\*Endereço atual: Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, 39440-000, Brasil.

#Endereço atual: Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, 37507-190, Brasil.

determina seu crescimento e fecundidade (Perry & Gauer, 1996).

O processo do parasitismo do nematoide depende do seu sucesso em diversas etapas, como a movimentação do nematoide no solo, penetração pela região meristemática e movimentação dentro do hospedeiro (Hussey & Grundler, 1998). Além disso, o estabelecimento da relação parasitária do juvenil de segundo estágio (J2) com a planta hospedeira é dependente da reserva de energia do J2 (Freire et al, 2007). Essa energia é proveniente do acúmulo de lipídio corporal durante o desenvolvimento embrionário (Lee & Atkinson, 1977). Para o acúmulo de reserva suficiente para o parasitismo, é necessário que durante o desenvolvimento embrionário, as fêmeas tenham uma boa nutrição.

Segundo Becker et al. (1999), a linhagem de feijoeiro L2300 provavelmente restringiria as reservas nutricionais dos J2, energia essa necessária ao processo de infecção. A alteração fisiológica ocasionada no desenvolvimento do nematoide pela restrição dos nutrientes afetaria também a viabilidade dos ovos no interior dos cistos. Desse modo, os objetivos do trabalho foram avaliar a viabilidade do inóculo de *H. glycines* multiplicado em hospedeiros suscetíveis e resistente, e a sobrevivência dos cistos no solo após o cultivo desses hospedeiros.

A população inicial de *H. glycines* raça 3 foi obtida de área comercial de soja da cv. FT-Cristalina, no município de Nova Ponte, MG. Solo infestado dessa área foi cultivado com soja da cv. FT-Cristalina em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. As plantas foram renovadas periodicamente para manter o inóculo em alta densidade populacional. Para implantar os ensaios, parte do inóculo foi multiplicada em feijoeiro linhagem L2300 (resistente ao nematoide de cistos da soja), parte em feijoeiro cv. Ouro (suscetível) e outra parte em soja cv. FT-Cristalina (suscetível) por três gerações consecutivas. Para obtenção dos ovos produzidos nas diferentes plantas hospedeiras, as raízes dessas plantas foram retiradas cuidadosamente dos vasos e imersas em um balde com água, para eliminar o excesso de solo. Essas raízes foram colocadas sobre uma peneira de malha de 0,85 mm de abertura acoplada a outra de 0,15 mm, e receberam um jato forte de água de torneira, para desalojar as fêmeas do sistema radicular. Os resíduos retidos na peneira de malha de 0,85 mm foram descartados, e as fêmeas retidas na outra peneira foram recolhidas com água em um béquer.

Alíquotas de 10 mL dessa suspensão de fêmeas foram colocadas em um esmagador de tecidos com capacidade de 40 mL, para liberar os ovos. A suspensão resultante foi vertida sobre uma peneira de malha de 0,075 mm acoplada a outra de 0,026 mm. Os ovos retidos na peneira de malha de 0,026 mm foram recolhidos em um béquer. A concentração da suspensão de ovos foi estimada ao microscópio estereoscópico, utilizando-se câmara de Peters e ajustada para 500 ovos/mL de água (Mizobutsi et al., 2006).

Para avaliar a penetração dos J2 multiplicados nos diferentes hospedeiros foi usada soja cv. FT-Cristalina (planta teste). Após a germinação das sementes em leito de areia esterilizada, as plântulas com aproximadamente 5 cm de altura foram transplantadas para recipientes plásticos (uma plântula/recipiente) com capacidade de 400 mL. A inoculação ocorreu aos dois dias após o transplantio, pela deposição de suspensão contendo 2.000 ovos de *H. glycines*/planta, e as plantas foram mantidas em casa de vegetação. Aos 10 dias após a inoculação (DAI), o sistema radicular foi separado da parte aérea e submetido a coloração *in situ* (Byrd et al., 1983). A avaliação consistiu da quantificação do número de juvenis que penetraram nas raízes, utilizando-se microscópio estereoscópico. As médias das temperaturas máxima e mínima do ar durante o ensaio foram de 32 e 19°C, respectivamente. A média da temperatura do solo nas horas mais quentes do dia foi de 23°C. O ensaio foi montado no delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições.

O desenvolvimento de *H. glycines* foi avaliado em plantas conduzidas em ensaio similar ao anterior, exceto pelo uso de vasos de argila com capacidade de 1,5 L, contendo uma mistura de solo e areia (1:1), previamente esterilizada, e pela avaliação que ocorreu aos 30 DAI. Quantificou-se o número de fêmeas por sistema radicular. O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, com dez repetições. As médias das temperaturas máxima e mínima do ar durante o ensaio foram 32 e 18°C, respectivamente.

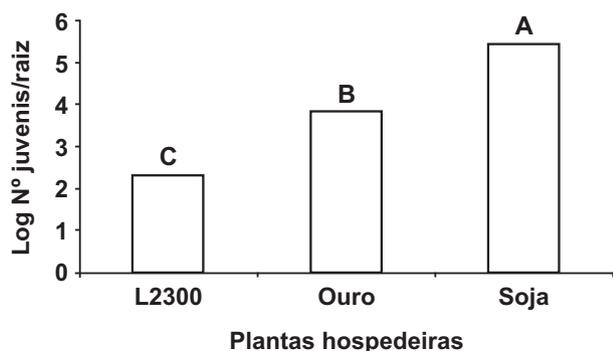
Os dados dos ensaios foram transformados para Log x, visando atingir a homogeneidade de variância, e submetidos a ANOVA e ao teste de Fisher a 5% de probabilidade,

Cistos de *H. glycines* foram obtidos ao final do ciclo do feijoeiro (linhagem L2300 ou cv. Ouro) ou da soja cv. FT-Cristalina para avaliar a sobrevivência do inóculo. Eles foram extraídos do solo pelo método da flutuação centrífuga em solução densa de sacarose (DUNN, 1969). O ensaio foi implantado como para a avaliação do desenvolvimento do nematoide, mas com 20 repetições e usando-se como inóculo 20 cistos por planta. Em cada vaso de 10 das repetições, transplantou-se uma planta de soja (planta teste). Essas plantas foram conduzidas por 30 dias, quando avaliou-se o número de fêmeas por sistema radicular. Nas outras 10 repetições, os vasos permaneceram sem planta e sem irrigação por 18 meses, quando efetuou-se o transplantio de uma planta de soja por vaso. Após 30 dias realizou-se a contagem do número de fêmeas por sistema radicular. A viabilidade do inóculo foi calculada pelo percentual do número de fêmeas obtidas aos 18 meses em relação ao número de fêmeas obtidas aos 30 dias. Usou-se o delineamento inteiramente ao acaso com 10 repetições. As médias das temperaturas máxima e mínima do ar durante o ensaio foram 32 e 17°C, respectivamente. Os dados foram submetidos a análise variância e quando as mesmas apresentaram significância, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

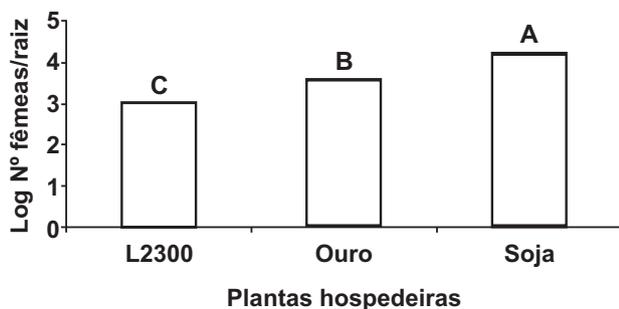
Houve diferença na penetração dos J2 multiplicados nas plantas de feijoeiro da linhagem L2300 e da cv. Ouro, que também diferiram das plantas de soja (Figura 1). O maior número de juvenis foi observado na planta teste (soja) quando utilizou-se o inóculo produzido na própria soja, e a menor penetração dos J2 ocorreu com o inóculo produzido na linhagem L2300).

Na avaliação do desenvolvimento de *H. glycines* em raízes de soja cv. FT-Cristalina, verificou-se menor número de fêmeas quando o inóculo foi produzido no feijoeiro da linhagem L2300, comparado àquele produzido no feijoeiro da cv. Ouro ou na soja (Figura 2). Maior número de fêmeas por sistema radicular foi obtido quando o inóculo foi produzido em plantas de soja.

A sobrevivência do inóculo de *H. glycines*, medida pelo número de fêmeas que infectaram a planta teste, caiu aos 18 meses, quando o nematoide foi multiplicado em feijoeiro, seja na linhagem L2300 ou na cv. Ouro. Em relação



**FIGURA 1** - Número de juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* em raízes de soja cv. FT-Cristalina, oriundos de inóculo multiplicado em plantas de feijão da linhagem L2300 (resistente) e da cv. Ouro (suscetível), e de soja cv. FT-Cristalina (suscetível). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Fisher.



**FIGURA 2** - Número de fêmeas de *Heterodera glycines* em plantas de soja cv. FT-Cristalina, infectadas a partir de inóculo multiplicado em plantas de feijão da linhagem L2300 (resistente) e da cv. Ouro (suscetível), e de soja cv. FT-Cristalina (suscetível). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Fisher.

ao inóculo produzido em soja, a redução na sobrevivência foi de 94 e 79% para aquele inóculo oriundo da linhagem L2300 e da cv. Ouro, respectivamente (Tabela 1).

Como a linhagem L2300 de feijoeiro é resistente a *H. glycines* acredita-se que a redução da reserva de nutrientes do nematoide seja a responsável pela baixa penetração dos juvenis nas raízes da planta suscetível (soja cv. FT-Cristalina). De acordo com Storey (1984), os juvenis, após a sua eclosão, permanecem infectivos por um período limitado e esse tempo está relacionado com a quantidade de reserva nutricional em seu corpo. Essa diminuição na infectividade dos J2 está associada com a redução dos lipídios, como já observado por outros autores (Van Gundy et al., 1967; Robinson et al., 1985; Wright et al., 1989), pois os J2 usam tais reservas na sua mobilidade. Mesmo na população multiplicada na cv. Ouro, que é um hospedeiro menos eficiente que a soja, observou-se menor penetração, confirmando esse fato.

A evolução do ciclo de vida do nematoide é dependente do metabolismo da planta e da disponibilidade de nutrientes no sítio de alimentação (sincícios), que vão determinar o seu crescimento e sua fecundidade. Segundo Becker et al. (1999), as fêmeas de *H. glycines*, estabelecidas na cv. Ouro (suscetível), apresentaram maior desenvolvimento e capacidade reprodutiva que aquelas desenvolvidas na linhagem L2300 (resistente). Deduziram que a resistência dessa linhagem está relacionada a limitação de ordem nutricional ou a fatores bioquímicos necessários ao desenvolvimento adequado do sincício. Sabe-se que quanto maior o sítio de alimentação, maior a área de exploração do tecido do hospedeiro e maior a disponibilidade de nutrientes (Perry & Gaur, 1996). Além disso, a qualidade dos nutrientes também influencia diretamente a fisiologia do nematoide (Cook et al., 1992).

Pelo fato da linhagem L2300 restringir o alimento necessário ao desenvolvimento normal do nematoide, acredita-se que haja redução nas reservas de energia do mesmo. Holz et al. (1999) estudaram a influência de cultivares de batata sobre o nível lipídico e a fecundidade de duas populações (boliviana e britânica) de *Globodera rostochiensis*. A variação no conteúdo de lipídeos, nos J2 da população boliviana, variou em mais de 200% entre as cultivares bolivianas, mas apenas 18% nas cultivares britânicas. Curiosamente, na população britânica, esse conteúdo variou 28% nessas mesmas cultivares.

Como esperado, o número de fêmeas de *H. glycines* oriundas da população multiplicada em soja foi superior ao do feijoeiro, e foi resultado da maior penetração dos J2 na planta, cujo teor de lipídeos não foi reduzido. Certamente, a formação de sincícios normais, característicos de uma boa hospedeira como é a soja, também contribuíram para tal resultado. De maneira similar, a sobrevivência de maior número de J2 nos cistos que foram produzidos na soja em relação aos feijoeiros, atesta essa explicação.

Em outros nematoides, que não os formadores de cistos, que têm um eficiente sistema de sobrevivência na

**TABELA 1** - Número de fêmeas de *Heterodera glycines* em plantas de soja cv. FT-Cristalina e percentual de sobrevivência calculado a partir de inóculo multiplicado em diferentes hospedeiros

Hospedeiros	Número de fêmeas*		Sobrevivência (%)
	1 mês	18 meses	
Feijoeiro linhagem L2300	16,7 Aa <sup>#</sup>	3,4 Ab	20,4
Feijoeiro cv. Ouro	35,2 Ba	12,2 Bb	34,7
Soja cv. FT-Cristalina	57,7 Ca	51,1 Ca	88,6

\*Média de dez repetições.

<sup>#</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

ausência de hospedeiros, também já se observou essa variação na penetração/infectividade dos J2. Freire et al. (2007) verificaram decréscimo na infectividade e imobilização dos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em condições de estresse, o qual estava relacionado à redução na reserva energética.

Conclui-se que *H. glycines* raça 3 apresenta viabilidade do inóculo e sobrevivência reduzidas quando em presença de hospedeiros resistentes ou menos favoráveis.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro indispensável para a realização do trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abawi GS, Jacobsen BJ (1981) Host efficiency and effect of initial densities of *Heterodera glycines* on growth of soybeans and dry beans under greenhouse conditions. *Phytopathology* 71:198. (Abstract)

Becker WF, Ferraz S, Silva EAM (1999) Alterações histopatológicas em raízes de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) infectadas por *Heterodera glycines*. *Nematologia Brasileira* 23:34-46.

Becker WF, Ferraz S (2000) Reação de genótipos de feijoeiro comum ao nematoide de cisto da soja. *Fitopatologia Brasileira* 25:559-563.

Byrd Jr DW, Kirpatrick J, Barker KR (1983) An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142-143.

Campos HD, Campos VP, Pozza EA (2006) Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em soja. *Fitopatologia Brasileira* 31:387-393.

Cook R, Thomas BJ, Mizen KA (1992) X-ray microanalysis of feeding syncytia induced in plants by cyst nematodes. *Nematologica* 38:36-49.

Dunn RA (1969) Extraction of cysts of *Heterodera glycines*

from soils by centrifugation in high density solutions. *Journal of Nematology* 1:7.

Freire ES, Campos VP, Dutra MR, Rocha FS, Silva JRC, Pozza EA (2007) Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. *Summa Phytopathologica* 33:270-274.

Halbrendt JM, Lewis SA, Shipe ER (1992) A technique for evaluating *Heterodera glycines* development in susceptible and resistant soybean. *Journal of Nematology* 24:84-91.

Holz RA, Troth K, Atkinson HJ (1999) The influence of potato cultivar on lipid content and fecundity of Bolivian and British populations of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology* 31:357-366.

Hussey RS, Grondler FW (1998) Nematode parasitism of plant. In: Perry RN, Wright DJ (Eds.) *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematode*. Wallingford UK. CABI International. p.213-243.

Lee DL, Atkinson HJ (1977) *Physiology of nematodes*. New York, EUA. Columbia University Press.

Mizobutsi EH, Ferraz S, Mizubuti ESG, Ribeiro RCF, Dias-Arieira CR, Brommonschenkel SH (2006) Avaliação dos componentes de resistência da linhagem L2300 de feijoeiro a *Heterodera glycines*. *Nematologia Brasileira* 30:251-257.

Perry RN, Gaur HS (1996) Host plant influence on the hatching of cyst nematodes. *Fundamental Applied Nematology* 19:1-6.

Riggs RD, Hamblen ML (1962) Soybean cyst nematode host-studies in the family *Leguminosae*. *Arkansas Agricultural Experiment Station Report Series*. 18p.

Robinson MP, Atkinson HJ, Perry RN (1985) The effect of delayed emergence on infectivity of juveniles of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Nematologica* 31:171-178.

Storey RMJ (1984) The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* spp. *Annual Applied Biology* 104:511-520.

Van Gundy SD, Bird AF, Wallace, HR (1967) Aging and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology* 57:550-571.

Wright DJ, Roberts FTJ, Evans AAF (1989) Effects of nematicide oxamyl on lipid utilization and infectivity in *Globodera rostochiensis*. *Parasitology* 98:151-154.