

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**CONTROLE BIOLÓGICO (*Glomus etunicatum*),
QUÍMICO (FIPRONIL) E ESTUDO MOLECULAR
(PCR-ITS) DO NEMATÓIDE DO CISTO DA SOJA
(*Heterodera glycines* Ichinohe)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tatiana Benedetti

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

**CONTROLE BIOLÓGICO (*Glomus etunicatum*), QUÍMICO
(FIPRONIL) E ESTUDO MOLECULAR (PCR-ITS) DO
NEMATÓIDE DO CISTO DA SOJA (*Heterodera glycines*
Ichinohe)**

por

Tatiana Benedetti

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência do Solo**

Orientadora: Prof. Zaida Inês Antonioli

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**CONTROLE BIOLÓGICO (*Glomus etunicatum*), QUÍMICO (FIPRONIL)
E ESTUDO MOLECULAR (PCR-ITS) DO NEMATÓIDE DO CISTO DA
SOJA (*Heterodera glycines* Ichinohe)**

elaborada por
Tatiana Benedetti

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA

Zaida Inês Antonioli
(Presidente/Orientadora)

Paulo Fernando Bertagnolli
(Co-Orientador/Embrapa - Trigo)

Marlove Fátima Brião Muniz
(UFSM)

A ti, meu pai, que me ensinou a sonhar e, acima de tudo, a lutar por estes sonhos! A ti que me ensinou a ter força pra enfrentar todas as situações e fé tamanha pra acreditar que tudo, por mais difícil que pareça, tem jeito, ou de se resolver ou de aprender a conviver...

EU DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e à minha irmã, que apesar das dificuldades que enfrentamos não permitiram em nenhum momento que eu pensasse em desistir;

A meu pai (*in memoriam*) e a meu irmão Everton (*in memoriam*) que, seja lá onde estiverem, me deram força e coragem e estão, tenho certeza, comemorando comigo;

A meus avós, tios e tias; que sabem a importância que tiveram para que eu ficasse aqui e concluísse esse trabalho;

Agradeço à professora Zaida Inês Antonioli pela orientação, mas acima de tudo pela amizade e companheirismo, por ter estado junto de mim não só no que dizia respeito ao trabalho de dissertação, mas em horas que, ela bem sabe, foram as mais difíceis de minha vida. Tudo o que eu lhe disser, professora, será ainda muito pouco para demonstrar a importância que tens para mim;

Aos amigos que, graças a Deus; são muitos para citar todos os nomes, mas todos sabem que é para vocês, que me deram força e suportaram meus dias de “cara amarrada”, ou pela tristeza, ou pelo cansaço...;

Ao Departamento de Solos pelo apoio e incentivo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, bem como a todos os professores do curso, pela formação;

À Débora Trichez e a Manuelli Lupatini, que fizeram com que este trabalho se realizasse;

A Ricardo Bemfica Steffen e sua família, os quais me apoiaram incondicionalmente em horas tão difíceis e sempre estiveram prontos para me ajudar em quaisquer circunstâncias;

Aos colegas do curso, que compartilharam comigo esta fase tão importante de minha vida;

À equipe do Prof. Jânio, principalmente à Adriana e à Andréia pela ajuda;

Ao Dr. Paulo Fernando Bertagnolli e à Prof. Marlove Fátima Brião Muniz, componentes da banca examinadora;

Aos funcionários Tarcísio, Flávio e Gladis pelo auxílio;

Ao CNPq pela bolsa de estudos;

Aos Engenheiros Agrônomos e/ou técnicos agrícolas dos municípios de Espumoso, Eugênio de Castro, Jóia, Tupanciretã e São Miguel das Missões, que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	07
Lista de Figuras.....	08
Resumo.....	09
Abstract.....	10
Introdução Geral.....	11
CAPÍTULO I	
1.1 Introdução.....	18
1.2 Material e Métodos.....	19
1.3 Resultados e Discussão.....	21
1.4 Conclusões.....	26
1.5 Referências Bibliográficas.....	27
CAPÍTULO II	
2.1 Introdução.....	29
2.2 Material e Métodos.....	32
2.2.1 Avaliação da soja micorrizada com <i>Glomus etunicatum</i> e inoculadas com nematóide do cisto da soja.....	33
a) Preparo e análise do solo.....	33
b) Obtenção das plântulas.....	33
c) Preparo do inóculo do nematóide do cisto da soja.....	33
d) Tratamentos.....	34
e) Instalação do experimento.....	34
f) Inoculação das plântulas com o nematóide do cisto da soja.....	34
g) Avaliações.....	34
h) Análise Estatística.....	36
2.2.2 Ação do Fipronil na eclosão de juvenis do nematóide do cisto da soja.....	36
2.3 Resultados e Discussão.....	37
2.3.1 Avaliação da soja micorrizada na presença de <i>Glomus etunicatum</i> e inoculada com nematóide do cisto da soja.....	
2.3.2 Ação do Fipronil na eclosão de juvenis do nematóide do cisto da soja.....	
2.4 Conclusões.....	43
2.5 Referências Bibliográficas.....	44
CAPÍTULO III	
3.1 Introdução.....	50
3.2 Material e Métodos.....	51
3.2.1 Obtenção e manutenção da população do nematóide do cisto da soja raça 3.....	51
3.2.2 Extração do DNA.....	51
3.2.3 Tratamento das amostras com RNase.....	52
3.2.4 Análise do produto em gel de agarose.....	52
3.2.5 Reação de PCR.....	52
3.2.6 Caracterização genética do nematóide do cisto da soja raça 3.....	52
3.3 Resultados e Discussão.....	53
3.4 Referências Bibliográficas.....	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- TABELA 1- População de cisto de *Heterodera glycines* coletados no período vegetativo de desenvolvimento da soja e níveis de pH, matéria orgânica (MO) e argila no solo em cinco municípios do Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2004..... 23
- TABELA 2 - Características químicas do solo coletado nos cinco municípios estudados no estado do Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2004..... 25

CAPÍTULO II

- TABELA 1- Características químicas do solo utilizado para montagem do experimento, Santa Maria, RS, 2004..... 33
- TABELA 2 - Valores médios de altura de plantas, número de nós, matéria seca (MS), número de nódulos, peso seco de raiz, comprimento de raiz, número de fêmeas e de cistos em cultivar de soja BR 154 inoculadas com *Glomus etunicatum* (GE) e nematóide do cisto da soja, Santa Maria, RS, 2004..... 39
- TABELA 3 - Percentual de eclosão de juvenis do nematóide do cisto da soja eclodidos na presença do Fipronil, Santa Maria, 2004..... 43

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 - Esquema do trabalho realizado para estudo do nematóide do cisto da soja (NCS), fungos micorrízicos arbusculares - FMA (<i>Glomus etunicatum</i>) e caracterização molecular.....	14
---	----

CAPÍTULO I

FIGURA 1- Lavouras de soja com sintomas do nematóide do cisto nos municípios de Tupanciretã (A), Espumoso (B), Eugênio de Castro (C), Jóia (D) e São Miguel das Missões (E), Santa Maria, RS, 2004.....	20
---	----

FIGURA 2 - Localização dos municípios no estado do Rio Grande do Sul onde se realizou o levantamento: 1- Espumoso, 2 -Eugênio de Castro, 3 - São Miguel das Missões, 4 – Jóia, 5 – Tupanciretã, Santa Maria, RS, 2004.....	21
--	----

CAPÍTULO II

FIGURA 1 - Sintomatologia do ataque do nematóide do cisto da soja (NCS) em plantas inoculadas com <i>Glomus etunicatum</i> , em casa de vegetação, Santa Maria, RS, 2004.....	40
---	----

CAPÍTULO III

FIGURA 1 – Cisto do nematóide do cisto da soja, Santa Maria, RS, 2004.....	53
--	----

FIGURA 2 – DNA genômico de nematóide do cisto da soja raça 3 (R3). Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder, Gibco (M), Santa Maria, RS, 2004.....	53
---	----

FIGURA 3 – Produto de PCR-ITS do nematóide do cisto da soja raça 3 (R3). Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder, Gibco (M), Santa Maria, RS, 2004.....	54
---	----

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CONTROLE BIOLÓGICO (*Glomus etunicatum*), QUÍMICO (FIPRONIL) E ESTUDO MOLECULAR (PCR-ITS) DO NEMATÓIDE DO CISTO DA SOJA

Autora: Tatiana Benedetti

Orientadora: Zaida Inês Antonioli

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de Fevereiro de 2005

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação e no laboratório de Microbiologia e Biologia do Solo e do Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, em três etapas. A primeira etapa objetivou realizar um levantamento da presença do nematóide de cisto da soja (NCS) em cinco municípios produtores de soja no estado do Rio Grande do Sul. O levantamento foi conduzido em oito diferentes áreas com cultivo da soja, tendo 28 locais de coleta de amostras, nos municípios de Espumoso, Eugênio de Castro, Jóia, São Miguel das Missões e Tupanciretã. As amostras de solo foram processadas em laboratório e os cistos do NCS foram extraídos pela técnica de peneiramento úmido. Detectou-se a presença do nematóide nos cinco municípios estudados, sendo que o maior número de cistos foi encontrado nos municípios de Espumoso e São Miguel das Missões. A segunda etapa da pesquisa objetivou avaliar a supressão da população do nematóide do cisto da soja através de plantas micorrizadas e testar a ação do fipronil na eclosão de juvenis do nematóide. Dois experimentos foram desenvolvidos. O primeiro foi composto por 10 tratamentos (testemunha, quatro tratamentos com ovos do NCS, 500, 1000, 2000 e 4000 sem micorriza; quatro tratamentos com micorriza e ovos de NCS). Neste experimento observou-se que a presença de *Glomus etunicatum* beneficiou o crescimento da planta. O segundo constituiu-se de experimento com fipronil e mostrou uma significativa redução na eclosão dos ovos de NCS. Observou-se que a adição de pequenas doses do fipronil foi capaz de diminuir a eclosão dos juvenis do NCS em 50%. A terceira etapa do trabalho teve por objetivo testar a caracterização do NCS via extração de DNA e técnica de PCR-ITS. Nesta etapa foi obtida uma boa extração de DNA dos cistos de *Heterodera glycines* e estudos estão sendo realizados para efetuar a caracterização via PCR-ITS.

ABSTRACT

Dissertation in Soil Science
Program of Pós-Graduation in Soil Science
Federal University of Santa Maria

BIOLOGICAL (*Glomus etunicatum*), CHEMISTRY (FIPRONIL) CONTROL AND MOLECULAR (PCR-ITS) STUDIES OF CIST NEMATODES IN SOYBEAN

Author: Tatiana Benedetti
Advisor: Zaida Ines Antonioli
Santa Maria, 25 February of 2005

The studies of cyst nematodes were evaluated in the greenhouse condition and in the Prof. Marcos Rubens Fries Environment and Soil Microbiology and Biology Laboratory, in the Soil Department of the Federal University of Santa Maria, in three stages. The first stage aimed to study through a survey of the presence of cyst nematodes in soybean (NCS), in five counties, in Rio Grande do Sul state. The survey was carried out in eight places with 28 samples with soybean culture. The counties were Espumoso, Eugênio de Castro, São Miguel das Missões and Tupanciretã. The soil samples had been processed in laboratory, and the NCS had been extracted by wet technique. It was detected presence of NCS in all five studied counties. The highest number of cysts was found in the counties of Espumoso and São Miguel das Missões. The second stage of the aimed to study the suppression of the NCS population using plants and to test the action of the fipronil on the egg hatching of NCS. Two experiments had been developed, the first with 10 treatments (without eggs of NCS and mycorrhizal, four treatments with different levels of eggs of NCS, 500, 1000, 2000 e 4000 eggs; with mycorrhizal; four treatment with mycorrhizal and eggs of NCS). In this experiment was observed that the presence of *Glomus etunicatum* fungi improved the plant grow. The study with fipronil showed significant reduction in hatching when the eggs were exposed to the different concentrations of fipronil. It was observed, that the addition of small levels of fipronil can reduce the hatching in 50%. The third stage of the work was to evaluate the DNA characterization of the *Heterodera glycines* cysts. It was obtained a good DNA extraction and experiments are carrying out to do the PCR-ITS studies.

INTRODUÇÃO GERAL

O nematóide de cistos da soja (NCS), *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, agente etiológico do nanismo amarelo, foi descrito pela primeira vez no Japão em 1915 e detectado nos Estados Unidos em 1954 (NOEL, 1992). No Brasil, esse nematóide foi encontrado na safra 91/92 (LIMA et al., 1992; LORDELLO et al., 1992; MONTEIRO & MORAES, 1992) e, atualmente, já está disseminado nas principais regiões produtoras de soja do país. No estado do Rio Grande do Sul, a presença deste organismo já foi constatada em 13 municípios das regiões do planalto e missões (BONATO et al., 2002).

Este nematóide tem causado elevados prejuízos à sojicultura mundial, apresentando uma ampla gama de hospedeiros, mas quase que restrita à família Fabaceae (FUJITA & MIURA, 1934; SKOTLAND, 1957; EPPS & CHAMBERS, 1958; 1959; 1966; RIGGS & HAMBLÉN, 1962). Relativamente, poucos representantes de outras famílias botânicas podem hospedar o parasito (RIGGS & HAMBLÉN, 1966).

A incidência destes organismos resulta, principalmente, em alterações morfofisiológicas das raízes, prejudicando o seu desenvolvimento e, em alguns casos, aumentando o número de raízes laterais, porém, com redução ou ausência de nodulação, de forma a acarretar redução na absorção e na translocação de água e nutrientes na planta.

Em geral, os danos podem ser maiores ou menores em função da população presente, que por sua vez, dependerá das condições ambientais, da planta hospedeira e da biologia destes nematóides. Entre os fatores relacionados à biologia dos nematóides, pode-se citar a ação da densidade populacional da espécie regulando o tamanho da população e a existência de variações patogênicas dentro das espécies (TARTÉ & PINOCHET, 1981). Estudos já comprovaram que vários fatores podem afetar a resistência de plantas ao ataque do nematóide, destacando-se o estado nutricional das plantas. Provavelmente, o fortalecimento das plantas em função da melhoria das condições físico-químicas do solo permitiu às plantas suportar maiores níveis de ataque, sem registrar grandes reduções na produtividade.

Neste contexto, insere-se a utilização de microrganismos capazes de promover um aproveitamento mais eficiente dos nutrientes do solo, bem como uma melhora no estado nutricional das plantas. Como exemplo destes microrganismos temos os chamados fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Os FMAs são fungos que se associam às raízes, aumentando a sua superfície de exploração e, com isso, permitindo a exploração de um maior volume de solo, aumentando, portanto, a absorção de nutrientes. O benefício para a planta

decorrente deste aumento na absorção de nutrientes se dá, principalmente, para o fósforo, que é pouco móvel no solo e por isso de difícil absorção.

Estes fungos têm se mostrado eficientes na melhora da nutrição de plantas e no aumento de crescimento, principalmente em solos com baixo teor de fósforo, quando cultivadas sob estresses ambientais (HARLEY & SMITH, 1983). O poder das FMAs como agentes de biocontrole tem despertado a atenção da comunidade científica nos últimos tempos (DEHNE, 1982; HARLEY & SMITH, 1983; HUSSEY & RONCADORI, 1982). Em geral, a severidade de várias doenças tem sido diminuída em plantas micorrizadas (GRANDISON & COOPER, 1986).

Tem sido observada variabilidade na interação de fungos micorrízicos arbusculares e fitonematóides, indicando que a associação hospedeiro-nematóide-fungo micorrízico arbuscular é bastante específica e que a alteração em um dos componentes pode levar à diversidade de resultados. Outros dados indicam que as reduções de crescimento, causadas pelo ataque de nematóides têm sido menores em plantas colonizadas por FMA, se comparadas às não micorrizadas (COFCEWICZ et al., 2001). Em pessegueiro, a colonização com FMAs reduziu o estresse causado pelo nematóide *Meloidogine incognita* (Fofold & White) Chitwood, proporcionando plantas mais desenvolvidas em relação às inoculadas unicamente com o patógeno (STROBEL et al., 1982). O aumento na tolerância da planta ao ataque do nematóide é considerado o principal efeito dos FMAs às plantas (COOPER & GRANDISON, 1986; RONCADORI & HUSSEY, 1977).

A colonização por fungos micorrízicos tem também alterado a reprodução dos nematóides, reduzindo em muitos casos a ovoposição e o número de indivíduos no sistema radicular de plantas micorrizadas. O efeito do FMAs sobre a reprodução do nematóide tem sido apontado como dependente de um elevado percentual de colonização da raiz por estes organismos (COFCEWICZ et al., 2001).

Para ser possível um controle racional dos nematóides, é necessária a busca de plantas de maior resistência ao ataque deste organismo. As variações fisiológicas das populações de *H. glycines* têm sido um fator limitante do processo, uma vez que o NCS apresenta grande variabilidade genética para patogenicidade. No Brasil, já foram identificadas mais de 11 raças do nematóide do cisto da soja (MENDES, 1993). A indução de resistência em uma cultivar para determinadas raças pode ser quebrada pelo surgimento de uma raça diferente na área. Para detecção de quais raças estão presentes em determinado local, os melhoristas usam séries diferenciadoras, ou seja, cultivares de soja que promovem a multiplicação de raças específicas em uma cultivar em detrimento de outras raças.

As perdas causadas por nematóides fitoparasitas têm aumentado significativamente nos últimos anos. A utilização de produtos químicos com o objetivo de diminuir as perdas devidas a nematóides foi importante no passado, mas atualmente o método apresenta alto custo. Além disso, os produtos químicos mais eficientes têm causado sérios problemas à saúde humana e ao ambiente (FASSULIOTIS, 1985). No entanto, vários produtos químicos, como, por exemplo, o carbofuran, turbofos e aldicarbe, vêm sendo testados para o controle destes organismos (NOVARETTI et al., 1998; ROCHA & CAMPOS, 2003).

A partir destes princípios, buscou-se observar as inter-relações existentes entre NCS e fungos micorrízicos arbusculares, avaliando a capacidade dos FMAs em aumentar a resistência da planta de soja à incidência deste nematóide, bem como avaliar a ação de um produto químico à base de fipronil na eclosão de juvenis do NCS. Para a caracterização molecular deste organismo foi extraído o DNA e realizado Reação de Cadeia de Polimerase (PCR). O trabalho foi executado conforme o esquema da Figura 1.

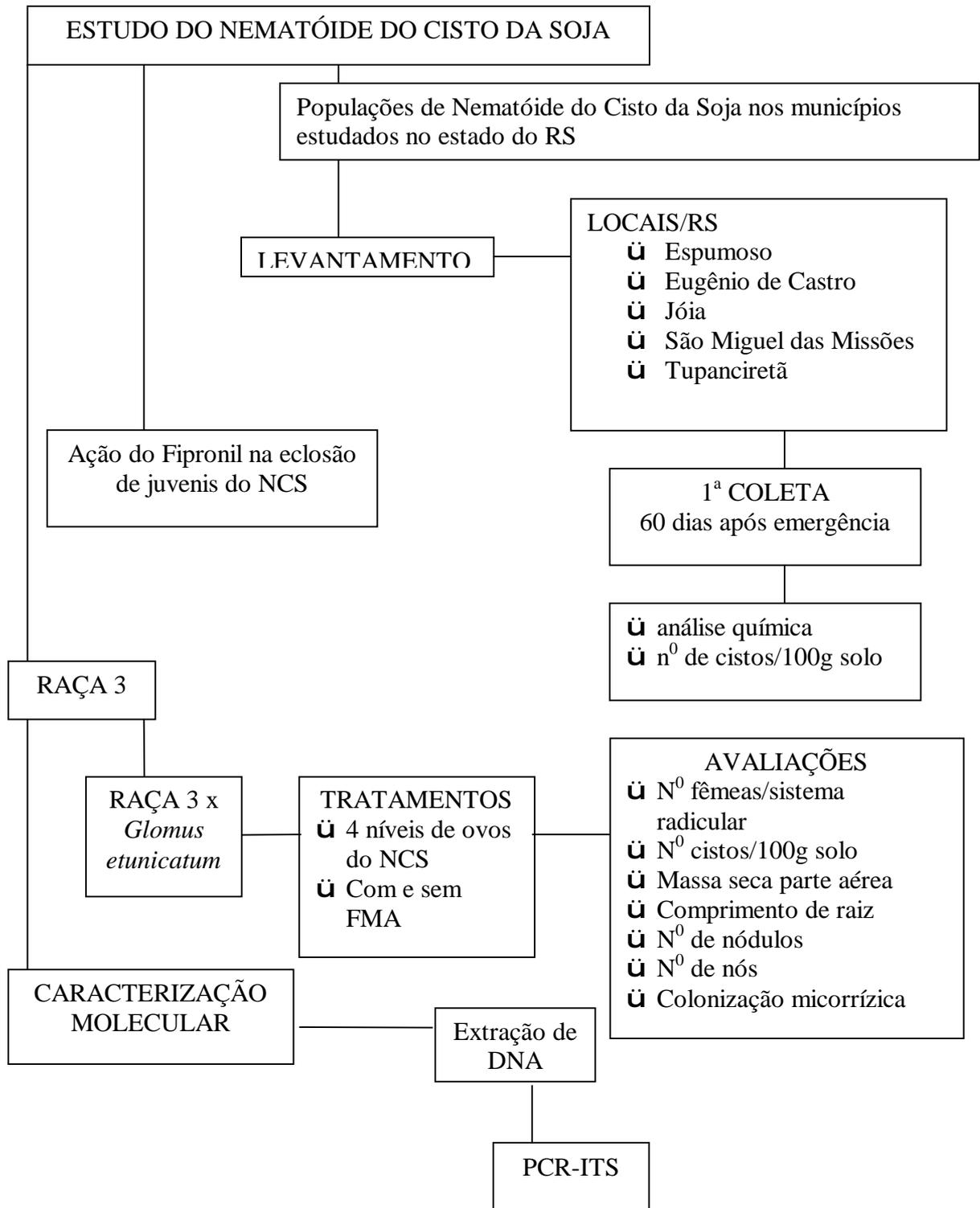


Figura 1: Esquema do trabalho realizado para estudo do nematóide do cisto da soja (NCS), fungos micorrízicos arbusculares-FMA (*Glomus etunicatum*) e caracterização molecular.

Referências Bibliográficas

BONATO, E.R.; COSTAMILAN, L.M.; FILHO, A.F. SILVA, J.F.V; BERTAGNOLLI, P.F. Distribuição do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) no Rio Grande do Sul. **Nematologia Brasileira**, v.26(1), p.97-100, 2002.

COFCEWICZ, E.; MEDEIROS, C.A.B.; CARNEIRO, R.; PIEROBOM, C. Interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* e os nematóides de galhas *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.26, n.1, 2001.

COOPER, K.M; GRANDISON, G.S. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizas with root-knot nematode on varieties of tomato and white clover susceptible to *Meloidogyne hapla*. **Annals of Applied Biology**, in press, 1986.

DEHNE, H.W. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 1115-1119, 1982.

EPPS, J. M.; CHAMBERS, A. Y. Comparative rates of reproduction of *Heterodera glycines* on 12 host plants. **Plant Diseases Report**, v. 50, n. 8, p. 608-610, 1966.

EPPS, J.M.; CHAMBERS, A.Y. Mung bean (*Phaseolus aureus*), a host of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Plant Diseases Report**, v. 43, n. 9, p. 981-982, 1959.

EPPS, J.M.; CHAMBERS, A.Y. New host records for *Heterodera glycines*, including one host in the Labiatae. **Plant Diseases Report**, v. 42, n. 2, p. 194, 1958.

FASSULIOTIS, G. The role of the nematologist in the development of resistant cultivars. **IN: SASSER, J.N.; CARTER, C.C.** In an advanced treatise on *Meloidogyne* I Biology and control. International *Meloidogyne* Project. **Raileng**, p. 232-240, 1985.

FUJITA, K.; MIURA, O. On the parasitism of *Heterodera schachtii* Schmidt on beans. **Trans. Sapporo Nature History Society**, v. 13, p. 359-364, 1934.

GRANDISON, G.S.; COOPER, K.M Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultivars of alfafa susceptible and resistant to *Meloidogyne hapla*. **Journal of Nematology**, v. 18 (2), p. 141-149, 1986.

HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. Mycorrhizal symbiosis. London, **Academic Press**, 1983.

HUSSEY, R.S.; RONCADORI, R.W. Vesicular-arbuscular mycorrhizal may limit nematode activity and improve plant growth. **Plant Disease**, v. 66, p. 9-14, 1982.

LIMA, R.D.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M. Ocorrência de *Heterodera* sp em soja no Triângulo Mineiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 16, n. 1/2, p. 101, 1992. (Resumo).

LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A.; QUAGGIO, J.A. Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 67, n. 3, p. 223-225, 1992.

MENDES, M.L. O nematóide do cisto da soja (NCS) e a sojicultura brasileira: situação atual. **Fitopatologia Brasileira**, 18: 254, 1993.

MONTEIRO, A.R.; MORAES, S.R.A.C. Ocorrência do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura no Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 16, n. 1/2, p. 101, 1992. (Resumo).

NOEL, G.R. History, distribution, and economics. **IN**: RIGGS, R.D.; WRATHER, J.A. (ed). Biology and management of the soybean cyst nematode. St Paul: **American Phytopathological Society**, p. 1-13, 1992.

NOVARETTI, W.R.T.; MONTEIRO, A.R.; FERRAZ, L.C.C.B. Controle químico de *Meloidogyne inognita* e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar com carbofuran e turbofos. **Nematologia Brasileira**, v. 22 (1), p. 60-74, 1998.

RIGGS, R. D.; HAMBLIN, M. L. Further studies on the hostrange of the soybean-cyst nematode. Fayetteville: **Agricultural Experiment Station**, 19p., 1966 (Bulletin).

RIGGS, R. D.; HAMBLIN, M. L. Soybean-cyst nematode host studies in the family Leguminosae. Fayetteville: **Agricultural Experiment Station**, 19p., 1962 (Report).

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de baixa dose de aldicarbe nos processos de eclosão a penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v. 27 (2), p. 185-192, 2003.

RONCADORI, R.W.; HUSSEY, R.S. Interaction of the enomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* and root-knot nematode on cotton. **Phytopathology**, v. 67, p. 1507-1511, 1977.

SKOTLAND, C. B. Biological studies of the soybean cyst nematode. **Phytopathology**, v. 47, n. 10, p. 623-625, 1957.

STROBEL, N.E.; HUSSEY, R.S.; RONCADORI, R.W. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Meloidogine incognita*, and soil fertility on peach. **Phytopathology**, v. 72, p. 609-694, 1982.

TARTÉ, R.; PINOCHET, J. Problemas nematológicos del banano. **UPEB**, 32p, 1981.

CAPÍTULO I. DENSIDADE POPULACIONAL DE NEMATÓIDES DO CISTO DA SOJA PROVENIENTES DE REGIÕES PRODUTORAS DE SOJA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

1.1 Introdução

A soja é a mais importante leguminosa produzida no Brasil. Durante os anos 70, as plantações de soja expandiram-se rapidamente da região sul, onde predominava a produção, para outras regiões, como o oeste, o centro e o norte brasileiro.

Vários gêneros de nematóides já foram identificados parasitando a soja no Brasil, como o *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp. e o *Helicothylenchus* sp. (MENDES & DICKSON, 1993). O *Heterodera glycines* Ichinohe, nematóide do cisto da soja (NCS), é o mais importante patógeno de soja nos Estados Unidos e no leste da Ásia (BALDWIN & MUNDO-OCAMPO, 1991). A primeira detecção no Brasil se deu no ano de 1992, em amostras de solo provenientes dos municípios de Nova Ponte, Minas Gerais (LIMA et al., 1992) e Campo Verde, Mato Grosso (LORDELLO et al., 1992). No estado do Rio Grande do Sul, a primeira ocorrência do nematóide do cisto da soja foi relatada por Carneiro & Almeida (1995) no município de Cruzeiro do Sul (BONATO et al., 2002). Posteriormente, foi relatada a presença do NCS em São Miguel das Missões. No ano de 2002 relatou-se a infestação de diversas áreas na região das Missões, onde está concentrada 87% da produção de soja do estado (BONATO et al., 2002).

De acordo com os estudos de áreas afetadas e estimativas de perdas realizadas por produtores e pesquisadores na safra de 1991/92, cerca de 10 mil hectares de soja haviam sido afetados, com perda da produção estimada em US\$ 1 milhão. Na safra de 1992/93, a área afetada havia expandido para mais de 200 mil hectares, com perda estimada em US\$ 24 milhões (YORINORI, 1993).

A incidência deste patógeno resulta, principalmente, em alterações morfofisiológicas das raízes, prejudicando o seu desenvolvimento e, em alguns casos, aumentando o número de raízes laterais, porém, com redução ou ausência de nodulação, de forma a acarretar redução na absorção e na translocação de água e nutrientes na planta.

Em geral, os danos podem ser maiores ou menores em função da população presente, que, por sua vez, dependerá das condições ambientais, da planta hospedeira e da biologia dos nematóides. Entre os fatores relacionados à biologia dos nematóides, pode-se citar a ação da

densidade populacional da espécie regulando o tamanho da população e a existência de variações patogênicas dentro das espécies (TARTÉ & PINOCHET, 1981).

Uma das alternativas mais viáveis para resolver o problema do aumento da população do nematóide é a utilização de cultivares de soja resistentes ao NCS. Várias cultivares já foram desenvolvidas através de melhoramento genético e mostram-se viáveis a campo. Há, contudo, uma grande dificuldade no desenvolvimento destas cultivares: a variação fisiológica dos NCS, pois este organismo apresenta variabilidade genética para patogenicidade. As populações são constituídas de misturas de raças e no Brasil, já foram identificadas as raças 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 14, 4+ e 14+ (MENDES, 1993). A resistência induzida em uma cultivar para determinadas raças pode ser quebrada pelo surgimento ou ação naquela área de uma raça diferente ou desconhecida do programa de melhoramento. Por isso, se faz necessário o conhecimento das populações existentes em cada local. Sendo assim, este estudo foi realizado com o objetivo de fazer um levantamento da presença do nematóide do cisto da soja em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul.

1.2 Material e Métodos

O levantamento foi conduzido em oito áreas com cultivo da soja em cinco diferentes municípios da região de grande expressão no cultivo da leguminosa no estado do Rio Grande do Sul. As áreas foram selecionadas com base na observação de supressão da produção, existência de plantas com sintomas da presença do parasita, clorose e crescimento irregular de plantas (Figura 1). Algumas áreas foram selecionadas pela proximidade aos locais onde as plantas com sintomas foram detectadas. Amostras de solo destas áreas também foram coletadas. As coletas foram realizadas nos municípios de Espumoso, na região do planalto gaúcho, Eugênio de Castro, Jóia e Tupanciretã, na região central do estado, e São Miguel das Missões, localizado na região das missões (Figura 2).

Em cada área foram extraídas amostras de solo e de raízes a 20 cm de profundidade. As amostras foram coletadas na zona das raízes das plantas, durante o período de desenvolvimento das mesmas. Foram coletados de dois a seis pontos por área.

O solo selecionado foi transportado ao Laboratório de Microbiologia e Biologia do Solo e do Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries, no Departamento de Solos, UFSM, onde foi mantido sob refrigeração até o momento de ser processado. Nas amostras coletadas foi analisado o número de cistos do nematóide do cisto da soja por 100 g de solo. Para extração dos cistos foram pesados 100 g de solo e realizados lavagem e peneiramento. O solo foi posto em um recipiente e adicionado de jatos fortes de água. Esta suspensão foi vertida em peneiras de

malha 25 e 100 meshes por três vezes. O solo suspenso nas peneiras foi recolhido com o auxílio de uma piceta e depositado em papel filtro contido em placas de Petry, as quais foram levadas ao microscópio estereoscópio sob aumento de 20 vezes. Em seguida, o número de cistos contado, sendo o resultado expresso no número de cistos/100g de solo.



Figura 1- Lavouras de soja com sintomas do nematóide do cisto nos municípios de Tupanciretã (A), Espumoso (B), Eugênio de Castro (C), Jóia (D) e São Miguel das Missões (E). Santa Maria, RS, 2004.

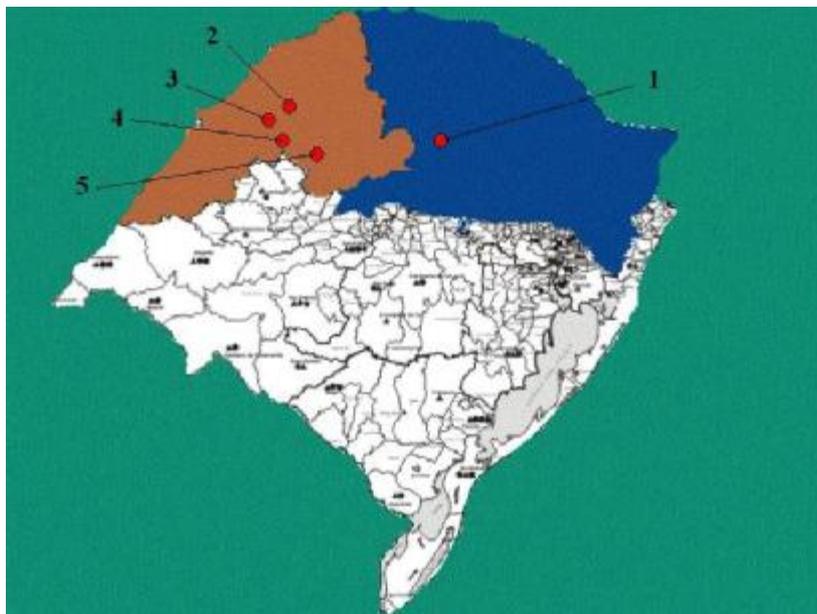


Figura 2- Localização dos municípios no estado do Rio Grande do Sul onde se realizou o levantamento. 1- Espumoso, 2 -Eugênio de Castro, 3 - São Miguel das Missões, 4 – Jóia, 5 – Tupanciretã, Santa Maria, RS, 2004.

1.3 Resultados e Discussão

A presença do nematóide do cisto da soja foi detectada nos municípios de Espumoso, Eugênio de Castro, Jóia, São Miguel das Missões e Tupanciretã. A ocorrência do número de cistos variou de 01 a 127 em Eugênio de Castro- área 5 e Espumoso- área 2, respectivamente (Tabela 1). Esta ocorrência generalizada demonstra a grande disseminação do nematóide nos solos do Rio Grande do Sul em que há cultivo da soja. Trabalhos realizados por Bonato et al. (2001) já haviam constatado a presença de nematóide do cisto da soja em diversos locais do estado. Neste trabalho, o número médio de cistos viáveis nas amostras de solo com maior infestação do NCS foi de 30,5 cistos. 100 cm³ de solo (BONATO et al., 2001).

O maior número de cistos foi coletado no município de Espumoso- área 2, seguido por São Miguel das Missões- área 7. O município de Espumoso apresentou a maior média de cistos de *H. glycines* (Tabela 1). É importante salientar que em todas estas áreas de estudo as sementes de soja utilizadas pelos produtores eram de variedades transgênicas tolerantes ao glifosato. Assim, a viabilidade do uso de variedades resistentes para o controle do NCS se torna um pouco mais difícil, pois há a necessidade de se disponibilizar aos produtores variedades de soja que apresentem, ao mesmo tempo, resistência ao nematóide do cisto da soja e alta produtividade.

A identificação do genótipo PI 437654, que apresenta resistência a todas as raças do NCS, permitiu utilizá-lo como fonte de resistência nos programas de melhoramento de soja

(ANAND et al, 1988). Do cruzamento de PI 437654 com Forrest, resultou a cultivar Hartwig que, segundo Anand (1992), também é resistente a todas as raças conhecidas de NCS. Essa cultivar tem sido muito utilizada nos programas de melhoramento genético no Brasil, para o desenvolvimento de cultivares de soja com resistência ao nematóide de cisto. No Brasil, as cultivares de soja mostram-se geralmente suscetíveis ao NCS. Em 1997, foi lançada pela EMBRAPA, no estado de Minas Gerais, a primeira cultivar de soja brasileira resistente à raça 3, o MGBR- 54 Renascença, seguida por várias outras .

Com relação ao pH do solo, em áreas do município de Eugênio de Castro, onde o pH variou de 5,3 a 6,8, a população de cistos foi baixa se comparada com as demais áreas nos outros municípios estudados. Devido a este resultado, tornou-se difícil fazer uma relação do pH com o número de cistos e serão necessários maiores estudos para definir os parâmetros desta relação (Tabela 1).

Com relação ao parâmetro de matéria orgânica no solo, pode-se observar que geralmente em níveis mais elevados de matéria orgânica a ocorrência de cistos é menor, enquanto que em níveis mais baixos ocorre um maior número de cistos de *H. glycines* (Tabela 1). Nos municípios de Espumoso e Tupanciretã (áreas 2 e 6) foram registrados os níveis mais baixos de matéria orgânica. Para Sharma (1993) a matéria orgânica melhora as condições de crescimento das plantas, aumentando sua tolerância ao ataque de nematóides.

Quanto aos tipos de solo, a área estudada abrange grande diversidade, que vai desde texturas bem argilosas com 79% de argila em São Miguel das Missões, até áreas mais arenosas, como a área 6, localizada no município de Tupanciretã, que apresenta 11% de argila (Tabela 1 e 2). Textura, argila e conteúdo de alumínio no solo parecem não ter relação na incidência de cistos de *H. glycines* a campo (Tabela 1). Um trabalho realizado por Koenning (1988) com cultivares suscetíveis ao NCS demonstrou que, principalmente, em períodos com escassez de água, a população de nematóides é menor em parcelas com grande conteúdo de areia.

Tabela 1 - População de cisto de *Heterodera glycines* coletados no período vegetativo de desenvolvimento da soja e níveis de pH, matéria orgânica (MO) e argila no solo em cinco municípios do Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2004.

Município	Local*	Nº de cistos. 100 g ⁻¹ de solo	pH (H ₂ O)	MO (%)	Argila (%)
Espumoso	1	99	5,7	2,4	33
	2	127	5,2	3,0	27
	3	64	5,2	2,4	30
	4	26	5,7	2,4	30
	5	24	5,2	2,8	33
	6	85	5,7	2,4	33
Eugênio de Castro	1	38	5,8	4,1	48
	2	09	5,3	3,5	42
	3	12	6,3	4,4	48
	4	405	6,8	4,4	44
	5	01	6,8	4,5	46
Jóia	1	26	5,6	4,9	62
	2	07	5,8	5,4	67
	3	30	5,9	4,8	67
São Miguel das Missões	1	37	5,1	4,3	48
	2	03	5,7	4,6	62
	3	36	5,4	3,9	67
	4	40	5,0	3,8	70
	5	50	5,3	4,1	72
	6	39	5,2	3,4	79
	7	117	5,0	4,4	65
	8	28	5,6	4,4	62
	9	31	5,2	3,9	69
Tupanciretã	1	24	5,7	1,5	29
	2	21	5,0	2,8	15
	3	19	5,3	1,7	60
	4	27	5,3	2,6	12
	5	50	5,3	3,5	32
	6	28	6,2	2,1	11

* Os locais foram selecionados conforme a ocorrência de sintomas do nematóide.

Considerando os teores de fósforo no solo nas diferentes áreas dos cinco municípios avaliados, pode-se observar que não houve influência do mesmo na população de cistos (Tabela 2). Este resultado está de acordo com trabalhos de Tylka et al. (1991), que afirma que os teores de fósforo no solo geralmente não apresentam efeitos sobre o nematóide do cisto. Entretanto, Smith & Kaplan (1988) observaram que a concentração de fósforo no tecido

vegetal foi menor em plantas afetadas pelo NCS, indicando que a presença do organismo pode afetar a absorção do elemento pela planta.

Os teores de potássio, cálcio e magnésio nas diferentes áreas de estudo parecem não mostrar relação positiva com a presença de cistos (Tabela 2). Estudos mais aprofundados são necessários para entender melhor a ação desses nutrientes em plantas atacadas pelo NCS, pois, conforme Smith & Kaplan (1988), o potássio e o magnésio não são afetados pela presença de nematóides na planta.

Tabela 2 - Características químicas do solo coletado nos cinco municípios estudados no estado do Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2004.

Município	Local*	Textura	Al (Cmol _c L ⁻¹)	P (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Ca (Cmol _c L ⁻¹)	Mg (Cmol _c L ⁻¹)
Espumoso							
	1	3	0,0	20,5	200,0	5,7	1,7
	2	3	0,1	21,8	186,0	6,1	1,2
	3	3	0,1	31,2	200,0	4,8	1,8
	4	3	0,0	20,5	200,0	5,7	1,7
	5	3	0,0	20,5	200,0	5,7	1,7
	6	3	0,0	20,5	200,0	5,7	1,7
Eugenio de Castro							
	1	2	0,0	33,0	182,0	6,5	2,9
	2	1	0,2	44,2	200,0	5,4	2,3
	3	2	0,0	32,0	200,0	7,6	3,2
	4	2	0,0	42,8	200,0	9,3	3,8
	5	2	0,0	35,3	200,0	9,0	3,8
Jóia							
	1	1	0,0	35,3	200,0	6,1	2,3
	2	1	0,0	35,3	200,0	6,1	2,3
	3	1	0,0	63,7	200,0	7,8	2,8
São Miguel das Missões							
	1	2	0,4	44,2	200,0	5,8	2,1
	2	1	0,0	46,3	200,0	8,1	3,3
	3	1	0,0	33,0	200,0	6,1	1,9
	4	1	0,3	17,5	186,0	5,3	1,9
	5	1	0,2	34,2	200,0	5,6	1,9
	6	1	0,2	13,0	200,0	5,9	2,1
	7	1	0,2	32,0	200,0	6,1	2,0
	8	1	0,0	48,5	200,0	6,2	2,6
	9	1	0,2	19,5	200,0	6,2	2,1
Tupanciretã							
	1	3	0,0	69,5	200,0	9,3	3,7
	2	1	0,3	63,7	200,0	4,5	1,6
	3	1	0,1	45,5	200,0	6,3	2,3
	4	1	0,2	69,5	200,0	5,5	2,2
	5	3	0,0	53,5	200,0	7,0	2,5
	6	1	0,0	80,0	200,0	6,1	2,6

* Os locais foram selecionados conforme a ocorrência de sintomas do nematóide.

1.4 Conclusões

Em todos os municípios estudados foi detectada a presença de nematóides do cisto da soja (*Heterodera glycines*) em áreas cultivadas com a soja.

Os municípios de Espumoso e São Miguel das Missões possuem áreas com cultivo de soja que apresentam os maiores índices de incidência do nematóide do cisto da soja.

1.5 Referências Bibliográficas

ANAND, S.C. Registration of Hartwig soybean. **Crop Science**, v. 32, p. 1069-1070, 1992.

ANAND, S.C.; GALLO, K.M.; BAKER, I.A.; HARTWIG, E.E. Soybean plant introduction with resistance to Races 4 and 5 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v. 28, p. 563-564, 1988.

BALDWIN, J.G.; MUNDO-OCAMPO, M. Heteroderinae, cyst and non-cyst forming nematodes. IN: NICKLE, W.R. (ed). Manual of Agricultural Nematology. New York. **Marcel Dekker**, Inc. p. 275-362, 1991.

BONATO, E.R.; COSTAMILAN, L.M.; FILHO, A.F.; SILVA, J.F.V.; BERTAGNOLLI, P.F. Distribuição do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) no Rio Grande do Sul. **Nematologia Brasileira**, v. 26(1), p. 97-100, 2002.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Detecção de *Heterodera glycines* em soja no Rio Grande do Sul. IN: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA TROPICAL**, XXVII, Rio Quente. Programa e anais, 73 p., 1995.

KOENNING, S.R.; ANAND, S.C.; WRATHER, J.A. Effect of within-field variation in soil texture on *Heterodera glycines* and soybean yield. **Journal of Nematology**, v. 20 (3), p. 373-380, 1988.

LIMA, R.D.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M. Ocorrência de *Heterodera* sp em soja no Triângulo Mineiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 16, n. 1/2, p. 101, 1992. (Resumo)

LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A.; QUAGGIO, J.A. Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 67, n. 3, p. 223-225, 1992.

MENDES, M.L. O nematóide do cisto da soja (NCS) e a sojicultura brasileira: situação atual. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 254, 1993.

MENDES, M.L.; DICKSON, D.W. Detection of *Heterodera glycines* on soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 77, p. 499-500, 1993.

SHARMA, R.D. Manejo de nematóide de cisto da soja. IN: **I Seminário Nacional sobre o nematóide do cisto da soja *Heterodera glycines***. Anais. Embrapa, Brasília, p. 113-124, 1993.

SMITH, G.S.; KAPLAN, D.T. Influence of mycorrhizal fungus, phosphorus, and burrowing nematode interactions on growth of rough lemon citrus seedlings. **Journal of Nematology**, v. 20 (4), p. 539-544, 1988.

TARTÉ, R.; PINOCHET, J. Problemas nematológicos del banano. **UPEB**, 32p, 1981.

TYLKA, G.L.; HUSSEY, R.S.; RONCADORI, R.W. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, phosphorus, and *Heterodera glycines* on soybean. **Journal of Nematology**, v. 23 (1), p. 122-133, 1991.

YORINORI, J.T. Epidemiologia e dinâmica de populações e controle. **IN: I Seminário Nacional sobre o nematóide do cisto da soja *Heterodera glycines***. Anais. Embrapa, Brasília, p. 65-76, 1993.

CAPÍTULO II. AÇÃO DO NEMATÓIDE DO CISTO DA SOJA RAÇA 3 EM CULTIVAR DE SOJA MICORRIZADA E AVALIAÇÃO DO USO DE FIPRONIL NA ECLOSÃO DE JUVENIS DO NEMATÓIDE DO CISTO DA SOJA

2.1. Introdução

Vários trabalhos têm demonstrado que os fungos micorrízicos podem atuar como agentes potenciais de biocontrole, amenizando os efeitos causados por fitopatógenos, como os nematóides. Provavelmente, isso ocorra por meios indiretos, através da melhor nutrição das plantas ou do aumento da resistência do sistema radicular (LINDERMAN, 1988, 1992). Alguns dados indicam que plantas micorrizadas apresentam maior tolerância ao ataque de fungos patogênicos. Diederichs (1987) demonstrou que a presença de várias espécies nativas de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em Latossolo Bruno do cerrado promoveu uma redução nos efeitos patogênicos causados por *Meloidogyne javanica* nas raízes de grão-de-bico.

O tipo e a magnitude da resposta depende do hospedeiro, da espécie de FMAs envolvida e da densidade de inóculo do fungo (ATILANO et al., 1981; SCHENK et al., 1975). A relação hospedeiro-nematóide pode ser caracterizada pela maior eficiência do hospedeiro em diminuir a reprodução do nematóide e as perdas de produção (COOK, 1974). A colonização das raízes por FMA pode alterar a resposta da planta ao ataque e ao desenvolvimento do nematóide. É conhecido também que a micorriza pode afetar os parâmetros de tolerância e resistência das plantas (GRANDISON et al., 1986). Esse aumento na tolerância da planta ao ataque do nematóide é considerado como sendo o principal efeito dos FMAs às plantas (COOPER & GRANDISON, 1986; RONCADORI & HUSSEY, 1977). Grandison et al. (1986) afirmam que o aumento da resistência de raízes ao ataque do nematóide *M. hapla* deve ser causado por algumas alterações fisiológicas na raiz resultantes da infecção micorrízica. Outra possibilidade para o mecanismo de indução de resistência da micorriza ao nematóide é sua ação no fluxo de água em plantas micorrizadas. A literatura cita algumas evidências de que os FMAs modificam a relação planta-água e de que as hifas podem alterar distorções causadas pelo nematóide nos tecidos da planta (COOPER, 1984).

Há variabilidade na interação de fungos micorrízicos arbusculares e fitonematóides, indicando que a associação hospedeiro-nematóide-fungo micorrízico arbuscular é bastante

específica e que a alteração em um dos componentes pode determinar diferentes resultados nesta associação simbiótica. Dados de pesquisa demonstram que as reduções de crescimento, consequência da infecção por nematóides, têm sido menores em plantas colonizadas por FMA comparativamente às não micorrizadas (COFCEWICZ et al., 2001). Em pessegueiro, a colonização com FMA reduziu o estresse causado pelo nematóide *Meloidogine incognita* (Fofold & White) Chitwood, proporcionando plantas mais desenvolvidas em relação com as inoculadas unicamente com o patógeno (STROBEL et al., 1982).

A colonização por FMA tem também afetado a reprodução dos nematóides, reduzindo em muitos casos a ovoposição e o número de indivíduos no sistema radicular de plantas infetadas. O efeito do FMA sobre a reprodução do nematóide tem sido apontado como dependente de um elevado percentual de colonização da raiz por estes organismos (COFCEWICZ et al., 2001).

Outro efeito do NCS na planta se dá sobre a simbiose soja-rizóbio. As respostas da nodulação têm sido diferentes em relação à raça do NCS. Por exemplo: raças 1, 2 e 4 do NCS causam supressão na nodulação e redução na capacidade de fixação de nitrogênio (LEHMAN et al., 1971), no entanto, a raça 3 não possui essa capacidade de inibir a nodulação (RIGGS & SCHMITT, 1987).

A utilização de associações biológicas pode ser um meio útil para minimizar também problemas de baixa fertilidade e acidez, geralmente encontrados nos solos brasileiros (GOEDERT, 1983; SANCHEZ & SALINAS, 1981; SANCHEZ & UEHARA, 1986). Os fungos micorrízicos apresentam um grande potencial no aumento da absorção de nutrientes do solo, principalmente do fósforo. A ocorrência de micorriza em condições naturais é freqüente e a maioria das plantas tropicais cultivadas, principalmente as de maior importância econômica, como por exemplo, soja, feijão, milho, café, arroz, entre outras culturas, podem ter suas raízes colonizadas por fungos micorrízicos (ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985). A pesquisa tem demonstrado os efeitos positivos das micorrizas na produtividade de grande número de culturas, sendo que o uso de práticas agrícolas como calagem, adubação adequada e utilização de adubação verde nos sistemas de produção, podem favorecer a propagação dos fungos micorrízicos no solo e estimular seus efeitos (BETHLENFALVAY, 1992).

Lopez et al. (1980) demonstraram que, em condições de extrema deficiência de fósforo, algumas leguminosas como o siratro (*Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urban) não nodulam, a menos que suas raízes sejam colonizadas por fungos micorrízicos ou que o solo seja adubado com elevadas doses de fósforo. Portanto, plantas colonizadas por FMA tornam-

se mais adaptadas às condições de deficiências nutricionais existentes no solo (LOPEZ & SIQUEIRA, 1981).

A eficiência da simbiose entre planta e fungo pode ser visualizada, também, na maior absorção de outros nutrientes pela planta, como o potássio (K) e o nitrogênio (N). Segundo Miranda & Miranda (1996), ocorre um acréscimo no conteúdo de K no sorgo micorrizado cultivado em solo de cerrado. O teor de N nas plantas pode ser afetado diretamente pelos FMA, através da absorção (pelas hifas) deste nutriente a partir de fontes orgânicas ou inorgânicas (AMES et al., 1984), ou indiretamente, através das relações sinérgicas com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico, principalmente com o rizóbio. Em solos onde ocorra deficiência de N e P, essa relação entre FMA e rizóbio é de grande importância, uma vez que a fixação biológica de N depende de um balanço nutricional adequado da planta hospedeira, especialmente do fósforo. Dados experimentais demonstram um acréscimo na absorção de N em plantas de soja inoculadas com *G. macrocarpum*. Em Latossolo de cerrado observou-se, também, que na ausência do fungo micorrízico arbuscular a soja adubada com N produziu maior quantidade de matéria seca do que a soja inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*. Na presença do FMA nativo esta diferença foi eliminada, aumentando a produção de matéria seca e os teores de P e N das plantas em ambos os tratamentos (MIRANDA & MIRANDA, 1996).

Nematóides são, geralmente, os fitoparasitas de mais difícil controle na agricultura (CHITWOOD, 2002). Normalmente, o controle deste organismo inclui a utilização de plantas resistentes, rotação de culturas e outras práticas culturais, ou o controle com nematicidas químicos. Existem dois grupos predominantes de nematicidas químicos: os **fumigantes** de solo de baixo peso molecular e os carbamatos ou organofosfatos de contato (WITEHEAD, 1997; BAKKER, 1993).

O controle de nematóides com nematicidas constitui um dos manejos mais antigos em uso na agricultura (ROCHA & CAMPOS, 2003). São vários os produtos, com efeito, nematicida no mercado brasileiro, os quais são, na maioria, sistêmicos (CAMPOS et al., 2001). O efeito do produto químico na eclosão dos juvenis de nematóides tem sido estudado com vários produtos nematicidas convencionais ou em desenvolvimento (HAQ et al., 1983; OSBORNE, 1973).

O controle químico é uma prática pouco utilizada no Brasil para a cultura da soja, devido, principalmente, ao alto custo dos nematicidas. Este tipo de controle passa por um período de reformulação em função do aparecimento de novos produtos e de formulações

mais práticas e seguras (NOVARETTI et al., 1998). No entanto, o processo para desenvolver novos nematicidas é complexo. Muitas espécies de nematóides parasitas de plantas são migratórias no solo ou dentro das raízes e ficam distantes do local de aplicação do nematicida químico, de modo que este não consegue atingi-los. Outro fator limitante desse tipo de controle é que esses organismos apresentam estruturas, como cutículas, que são impermeáveis a muitas moléculas orgânicas. Com isso, muitos nematicidas têm a tendência de apresentarem baixa toxicidade ou serem voláteis, podendo causar danos ambientais como a contaminação de lençóis freáticos ou a diminuição da camada de ozônio (THOMAS, 1996).

O custo de registro de produtos químicos é outro fator limitante do desenvolvimento de novos nematicidas. Os grupos de pesquisa em agroquímicos estão se limitando ao desenvolvimento de produtos com maior potencial de mercado, como os herbicidas e inseticidas, ao invés de nematicidas. Um destes inseticidas que vem sendo utilizado em larga escala é um inseticida do grupo dos fenilpirazoli, o qual possui o produto químico fibronil como princípio ativo. Esse produto é utilizado para o controle de insetos como o tamanduá-da-soja (*Sternechus subsignatus*), tripses (*Frankliniella schultzei*) e bicheira-da-raiz-do-arroz (*Oryzophagus oryzae*). Porém, esse produto não foi ainda testado em organismos como os nematóides. Este fenilpirazoli causa distúrbios no funcionamento do sistema nervoso central, por bloquear o canal GABA dos neurônios. O sistema receptor GABA é responsável por inibir a atividade nervosa prevenindo estímulos excessivos dos nervos. Quando a função normal do sistema é bloqueada pelo fibronil, o resultado é uma excitação nervosa excessiva, que causa a morte do inseto (COLE, 1993). Esse princípio é capaz de matar insetos por contato e ingestão, e é efetivo nos estágios adulto e larval (COLLIOT, 1992).

Assim, esta etapa do trabalho teve por objetivo avaliar a supressão da população do nematóide do cisto da soja através de plantas inoculadas com o fungo micorrízico *Glomus etunicatum* e testar a ação do produto químico fibronil na eclosão de juvenis do nematóide.

2.2. Material e Métodos

Este estudo foi realizado em duas etapas: 1) Avaliação da soja micorrizada com *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann e inoculada com nematóide do cisto da soja; 2) Ação do Fibronil na eclosão de juvenis de nematóide do cisto da soja.

2.2.1) Avaliação da soja micorrizada com *Glomus etunicatum* e inoculada com nematóide do cisto da soja

a) Preparo e análise do Solo

Para avaliação da resistência da cultivar de soja micorrizada à ação do nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichnohe, 1952) foi instalado um experimento na casa de vegetação do Departamento de Solos da UFSM.

O solo usado foi obtido de uma amostra composta (0 –20 cm) por um Argissolo Vermelho distrófico típico (EMBRAPA, 1999) coletado no campus da UFSM. Foi fornecida ao substrato a adubação exigida pela cultura (ROLAS, 1997) (Tabela 1). O pH foi corrigido para 6,0 por meio da adição de calcário dolomítico (CaCO_3). O nitrogênio foi suprido via fixação biológica através da adição às sementes de 4 mL de uma suspensão de células (cerca de 1×10^6 mL) de *Bradyrhizobium elkanii*, estirpes Semia 587 e 5079 (CPAC 15). A irrigação foi mantida próxima à capacidade de campo através da pesagem dos vasos.

b) Obtenção das plântulas

Sementes de soja da cultivar BRS 154, susceptível ao nematóide do cisto da soja, foram semeadas em bandejas de isopor contendo areia esterilizada. A areia foi autoclavada a 121°C por 2 horas e, posteriormente, secada em estufa a 50°C por 24 horas. As sementes de soja foram desinfetadas superficialmente com solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5% em água durante dois minutos.

No substrato utilizado para obtenção das plântulas foi efetuada uma inoculação com 1g de uma concentração de esporos com 120 esporos g^{-1} de *Glomus etunicatum* (Becker & Gerdemann), de acordo com os tratamentos estabelecidos. O inóculo de *G. etunicatum* foi obtido junto à Embrapa Agrobiologia/ Rio de Janeiro e multiplicado em casa de vegetação do Departamento de Solos/ UFSM/ RS.

Tabela 1. Características químicas do solo utilizado para montagem do experimento, Santa Maria, RS, 2004.

Parâmetros	Textura	Argila (%)	pH H_2O	Al (CmolcL^{-1})	MO (%)	P (Mg L^{-1})	K (Mg L^{-1})	Ca (Cmolc L^{-1})
	4	23	6,5	0,0	1,2	7,2	42,0	7,4

c) Preparo do inóculo do nematóide do cisto da soja

Os ovos de nematóide do cisto da soja foram inoculados nos vasos através de uma solução preparada no momento do transplante das mudas, conforme os tratamentos. O inóculo do NCS raça 3 (RIGGS & SMITT, 1988) foi cedido pelo Dr. Paulo Fernando Bertagnoli, da Embrapa CNPT/Passo Fundo/RS. O NCS foi mantido e multiplicado em soja suscetível,

cultivar Lee, em casa de vegetação do Departamento de Solos/UFSM/RS. Os cistos do NCS foram obtidos de uma alíquota de 100 cm³ de solo seco proveniente dos vasos de multiplicação de NCS, a qual foi suspensa em água e vertida através de peneiras de abertura de malha de 25 e 100 µm. O material que ficou retido na peneira de 100 µm foi macerado com bastão sobre uma peneira de 500 µm. O material retido na peneira de 500 µm foi recolhido em um Becker e contado em câmara de Peters e microscópio óptico com aumento de 20 vezes. A concentração de ovos foi estabelecida segundo os tratamentos necessários para inoculação dos vasos, conforme item 1.4. A inoculação dos nematóides ocorreu aos 15 dias após a semeadura, no momento do transplante das plantas da bandeja para os vasos.

d) Tratamentos

O experimento foi constituído com 10 tratamentos em delineamento inteiramente casualizados, com seis repetições. Os tratamentos foram: T1) Cultivar BRS 154 x nível 0 de inóculo do NCS; T2) BRS 154 x nível de inóculo do NCS de 500/ml; T3) BRS 154 x nível de inóculo do NCS de 1000/ml; T4) BRS 154 x nível de inóculo do NCS de 2000/ml; T5) BRS 154 x nível de inóculo do NCS de 4000/ml; T6) BRS 154 x *G. etunicatum*; T7- BRS 154 x nível de inóculo do NCS de 500/ml x *G. etunicatum*; T8) BRS 154 x nível de inóculo do NCS de 1000/ml x *G. etunicatum*; T9) BRS 154 x nível de inóculo do NCS de 2000/ml x *G. etunicatum*; T10- BRS 154 x nível de inóculo do NCS de 500/ml x *G. etunicatum*.

e) Instalação do experimento

Quinze dias após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos de 500 g com substrato composto de uma mistura de duas partes de areia e uma de solo (v:v). Esse substrato foi esterilizado com brometo de metila. Os vasos foram mantidos na casa de vegetação do Departamento de Solos/ UFSM pelo período de 30 dias. Durante o período de cultivo foi feita irrigação para capacidade de campo através da pesagem dos vasos. Sete dias após o transplante, iniciou-se a irrigação das mesmas com uma solução de nutrientes (macronutrientes e micronutrientes). Esta solução foi adicionada na quantidade de 10 mL uma vez por semana e foi preparada com 1,2 ppm de Zn, na forma de ZnCl₂, 0,8 ppm de Cu, na forma de CuCl₂, 0,4 ppm de B, na forma H₃BO₃, 0,2 ppm de Mn, adicionado na forma de MnCl₂.4H₂O, 0,01 ppm de Mo, na forma de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O e 9,0 ppm de K adicionado na forma de K₂SO₄.

f) Inoculação das plântulas com o nematóide do cisto da soja

Para a inoculação dos ovos foi aberto, com auxílio de um bastão de vidro, um orifício de aproximadamente dois cm ao lado das plântulas. A solução de ovos de nematóides extraídos conforme item 1.3 foi depositada no orifício e este foi fechado com solo do vaso. A inoculação ocorreu aos 15 dias após a semeadura, no momento do transplante das plantas da bandeja para os vasos.

g) Avaliações

Trinta dias após a inoculação foi efetuada a avaliação das plantas, sendo avaliado o número de fêmeas/sistema radicular (TIHOHOD & SANTOS, 1993), o número de cistos/100 cm³ de solo, a altura de plantas, o número de nós por planta, o número de nódulos de rizóbio por planta, massa seca de raiz e de parte aérea, e comprimento de raiz.

1) Número de fêmeas/sistema radicular

Para avaliação do número de fêmeas no sistema radicular das plantas de soja, o sistema radicular das amostras foi colocado sobre um conjunto de peneiras de 25 e 100 µm e lavado com um jato forte de água até as raízes ficarem visivelmente sem fêmeas (4 a 5 vezes). O material retido na peneira de 100 µm foi recolhido em placas de Petry e contado sob microscópio estereoscópico com aumento de 20 vezes.

2) Número de cistos/100 cm³ de solo

O número de cistos foi avaliado a partir de uma alíquota de 100 cm³ de solo de cada amostra, a qual foi seca ao ar e destorroada. A alíquota foi posta em um recipiente sobre o qual verteu-se água de torneira até transbordar. A solução foi vertida sob um conjunto de peneiras de 25 e 100 µm por três vezes. O material retido na peneira de 100 µm foi recolhido sobre papel toalha em placas de Petry e contados em microscópio estereoscópico com aumento de 20 vezes.

3) Altura de plantas

A altura de plantas foi medida, com régua, a partir do colo da planta e os resultados expressos em cm.

4) Número de nós/planta

O número de nós foi contado a partir do colo das plantas até o último nó na parte superior da planta.

5) Número de nódulos de rizóbio por planta

O sistema radicular das plantas foi levado ao laboratório onde os nódulos foram destacados e contados.

6) Massa seca de parte aérea

Após a coleta das plantas, a parte aérea destas foi destacada ao nível do colo e acondicionada em estufa a 65°C, para secagem do material. Após a secagem foi determinada a massa seca da parte aérea.

7) Comprimento de raiz

Para determinação do comprimento de raízes foi medido o comprimento da raiz pivotante a partir da região do colo da planta. A medição foi feita com o auxílio de uma régua e os resultados expressos em cm.

8) Associação micorrízica

No laboratório, as raízes foram submetidas ao processo de clareamento e coloração, conforme a metodologia de Koske & Gemma (1989) e Grace Stribley (1991). A avaliação da porcentagem de colonização micorrízica (CM) foi estimada utilizando-se 10 segmentos de raízes coloridas em lâminas sob microscópio composto com amplificação entre 100 e 1000 vezes (óleo de imersão), segundo Giovanetti & Mosse (1980).

h) Análise Estatística

As características avaliadas foram submetidas à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para a análise estatística, os dados obtidos das avaliações foram transformados para raiz quadrada de $X+0,5$.

2.2.2) Ação do Fipronil na eclosão de juvenis de nematóide do cisto da soja

Foi montado um ensaio biológico no Laboratório de Microbiologia e Biologia do Solo e do Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries, no Departamento de solos/UFSM, para testar a ação de um inseticida da classe química dos Fenilpirazoli (princípio ativo Fipronil) na eclosão de ovos de nematóide do cisto da soja. Este ensaio foi realizado com ovos livres de *Heterodera glycines* obtidos a partir de cistos viáveis provenientes de solo infestado com o nematóide e cultivado com plantas de soja cultivar Lee. Estes vasos de cultivo foram mantidos em casa de vegetação. Os cistos do NCS foram obtidos de uma alíquota de 100 cm³ de solo seco proveniente dos vasos de multiplicação de NCS, a qual foi suspensa em água e vertida através de peneiras de abertura de malha de 25 e 100 µm. Para a obtenção dos ovos livres, macerou-se cuidadosamente os cistos retidos na peneira de 100 µm com bastão de vidro, sobre uma peneira de 500 µm. Os ovos liberados ficaram retidos na peneira de 500 µm. Esse material foi recolhido em um Becker e contado em microscópio óptico com aumento de 20 vezes. A suspensão de ovos foi, então, calibrada para 600 ovos/ml de água com o auxílio

de câmara de Peters. O ensaio foi montado em placas de Petri, nas quais foram depositados 0,5 ml da suspensão de ovos e diferentes doses do produto químico a ser testado, conforme os tratamentos. As placas foram mantidas no escuro, em incubadora a 26°C. Após 12 dias de incubação, contou-se o número de juvenis eclodidos e de ovos remanescentes, em microscópio óptico com auxílio de câmara de Peters. A porcentagem de eclosão foi calculada pela seguinte fórmula: Porcentagem de eclosão = [número de juvenis/(número de juvenis + número de ovos)]x 100.

Os tratamentos estabelecidos foram os seguintes: T1) 0,5 ml de solução de ovos +150 ml/ha do princípio ativo do produto (PA); T2) 0,5 ml de solução de ovos + 20 ml/ha do PA; T3) 0,5 ml de solução de ovos + 300 ml/ha do PA; T4) 0,5 ml de solução de ovos + 40 ml/ha do PA; T5) 0,5 ml de solução de ovos + 600 ml/ha do PA; T6) 0,5 ml de solução de ovos. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Avaliação da soja micorrizada na presença de *Glomus etunicatum* e inoculada com nematóide do cisto da soja

Conforme os resultados obtidos, pode-se observar que houve ação do fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* no desenvolvimento de plantas com ataque do nematóide do cisto da soja (Tabela 2 e Figura 1). Este efeito está bem comprovado por outros trabalhos (TYLKA et al., 1991). Vários autores têm descrito a eficiência destes fungos na diminuição da severidade de várias doenças (GRANDISON & COOPER, 1986; DEHNE, 1982; SCHENCK & KELLAM, 1978). Cook & Evans (1987) afirmam que plantas de soja colonizada por FMAs se mostram mais tolerantes ou menos sensíveis à presença do nematóide do cisto da soja do que as plantas não micorrizadas, em casa de vegetação.

Neste experimento, a presença dos FMAs favoreceu o aumento na altura de plantas em 10% em apenas 45 dias e proporcionou o aumento em 37% na altura de plantas nos tratamentos com 2000 ovos de nematóide do cisto da soja. Este resultado está de acordo com Tilka et al. (1991), que afirmam que a presença dos FMAs aumenta o crescimento e peso de plantas. Observa-se que os tratamentos com nível de inóculo de 2000 e 4000 ovos do NCS sem a colonização micorrízica apresentaram a menor altura de plantas, sendo esta ainda menor que a testemunha sem o FMAs, demonstrando o efeito prejudicial do NCS (Tabela 2 e Figura 1). A maior altura de plantas foi encontrada no tratamento com plantas micorrizadas e nível de inóculo do NCS de 2000 ovos do NCS. Contudo, no tratamento com plantas micorrizadas e 4000 ovos do NCS, a altura de plantas foi bastante semelhante àquela do

tratamento com esse nível de inóculo do NCS na ausência do FMAs (T5). Isso pode ocorrer devido à presença de um alto nível de inóculo do NCS, que indica que o efeito supressivo do FMAs pode ser encontrado até certo nível de inóculo do patógeno, sendo que este efeito pode ser suprimido em altas populações do nematóide (Tabela 2). Esse efeito também foi observado no número de nós das plantas de soja. O menor número de nós foi encontrado no tratamento com FMAs e 4000 ovos do NCS (T10), o que não diferiu estatisticamente dos tratamentos sem o FMAs e sem NCS (T1) e sem FMAs e com 4000 ovos do NCS (T5). O maior número de nós foi encontrado nas plantas micorrizadas e com 2000 ovos do NCS (T9), o que não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, com exceção dos tratamentos acima citados (T10, T1 e T5). A presença dos FMAs aumentou o número de nós em 15%, comparando-se as plantas não micorrizadas sem nematóide (T1) e às micorrizadas sem nematóide (T6). Já na presença de 2000 ovos do nematóide do cisto da soja, a micorrização das plantas favoreceu o aumento no número de nós em 10% (Tabela 2).

A matéria seca das plantas de soja, avaliada aos 45 dias após o plantio (DAP), não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, porém, o maior valor de matéria seca foi encontrado nas plantas micorrizadas e com 2000 ovos do NCS (T9), e plantas micorrizadas com 1000 ovos do nematóide (T8), sendo esta 0,29 g e 0,28 g, respectivamente. O aumento na massa seca pela presença dos FMAs foi de 14%, observado pela comparação entre plantas não micorrizadas e micorrizadas sem inóculo do nematóide do cisto (T1 e T6). O menor valor de massa seca foi obtido nas plantas não micorrizadas e com 4000 ovos do nematóide do cisto (T5), e nas plantas micorrizadas com 4000 ovos do nematóide (T10), sendo 0,165 e 0,17 g. Isso indica que a eficiência dos FMAs pode existir até certo nível de população do nematóide do cisto da soja. (Tabela 2).

Quanto ao número de nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, os valores não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Porém, pode-se observar uma supressão da nodulação nas plantas não micorrizadas e com altos níveis de inóculo do nematóide do cisto da soja (T4 e T5). A maior nodulação foi observada em plantas micorrizadas e com 2000 ovos do NCS (T9). Em plantas micorrizadas e com 4000 ovos do nematóide (T10), a nodulação teve valores próximos às plantas não micorrizadas, o que pode ser conferido ao alto nível de inóculo do NCS. A presença dos FMAs favoreceu a nodulação em 60%, comparando os tratamentos com e sem micorriza, e com 2000 ovos do nematóide (Tabela 2).

Tabela 2- Valores médios de altura de plantas, número de nós, matéria seca (MS), número de nódulos, peso seco de raiz, comprimento de raiz, número de fêmeas e de cistos em cultivar de soja BR 154 inoculadas com *Glomus etunicatum* (GE) e nematóide do cisto da soja, Santa Maria, RS, 2004.

Tratamento	Altura de plantas (cm)	Nº de nós	MS (g)	Nº nódulos	Peso Seco raiz (g)	Comp. de raiz (g)	Nº fêmeas	Nº cistos
T1) TESTEMUNHA	19,40 ab*	3,40 bc	0,18 a	6,40 a	0,090 ab	25,00 abc	0,0 a	0,0 a
T2) NSC500	23,52 ab	4,00 ab	0,26 a	8,60 a	0,118 ab	23,58 abc	1,8 a	9,6 b
T3) NSC 1000	20,22 ab	4,00 ab	0,21 a	7,20 a	0,108 ab	25,78 abc	0,8 a	13,6 ab
T4) NSC 2000	16,90 b	3,80 ab	0,21 a	4,00 a	0,106 ab	22,12 bc	1,2 a	11,4 ab
T5) NSC 4000	15,68 b	3,60 abc	0,16 a	4,60 a	0,064 b	16,80 c	4,0 a	20,6 ab
T6) GE	21,64 ab	4,00 ab	0,21 a	6,40 a	0,112 ab	33,08 a	0,0 a	0,0 a
T7) NSC 500 X GE	18,20 ab	3,80 ab	0,25 a	7,20 a	0,098 ab	29,26 ab	0,2 a	10,8 ab
T8) NSC 1000 X GE	20,38 ab	4,00 ab	0,28 a	9,40 a	0,142 a	32,68 ab	1,6 a	15,2 ab
T9) NSC 2000 X GE	26,80 a	4,20 a	0,29 a	10,20 a	0,126 a	31,58 ab	2,4 a	19,2 ab
T10) NSC 4000 X GE	15,96 b	3,00 c	0,17 a	5,40 a	0,108 ab	23,16 abc	1,4 a	21,4 ab

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



1000 ovos do nematóide do cisto da soja



1000 ovos do NCS e *Glomus etunicatum*



2000 ovos do nematóide do cisto da soja



2000 ovos do NCS e *Glomus etunicatum*



4000 ovos do nematóide do cisto da soja



4000 ovos do NCS e *Glomus etunicatum*

Figura 1- Sintomatologia do ataque do nematóide do cisto da soja (NCS) em plantas inoculadas com *Glomus etunicatum*, em casa de vegetação, Santa Maria, RS, 2004.

Com relação ao peso seco de raiz, as plantas micorrizadas e com 1000 e 2000 ovos do nematóide do cisto da soja (T8 e T9 respectivamente) apresentaram maior peso de raiz. O menor peso de raiz foi apresentado pelas plantas não micorrizadas e com alto nível de inóculo de NCS (T5, com 4000 ovos do NCS). A presença da micorriza favoreceu o aumento do peso seco de raiz em 20%, comparando-se plantas micorrizadas e não micorrizadas (Tabela 2 e Figura 1). Quanto ao comprimento de raízes, as plantas micorrizadas e com 4000 ovos de nematóide do cisto da soja (T5) apresentaram o menor valor. O tratamento micorrizado e sem nematóide (T6) teve o maior comprimento de raiz, demonstrando um favorecimento dos FMAs no aumento da superfície radicular. No geral, as plantas não micorrizadas apresentaram menor desenvolvimento de raiz. As plantas micorrizadas e com menores níveis de nematóide (500, 1000 e 2000 ovos) não diferiram do tratamento micorrizado (T6). A presença dos FMAs favoreceu o desenvolvimento de raízes em 24% entre as testemunhas (T1 e T6) e em 27% entre os tratamentos com o maior nível de inóculo do NCS (T5 e T10) (Tabela 2).

Quanto aos parâmetros de peso e comprimento de raiz, os dados encontrados neste trabalho estão de acordo com autores que afirmam que plantas não micorrizadas apresentam menor peso e comprimento de raiz com o aumento do nível de NCS (TYLKA, 1991).

Já outros trabalhos têm demonstrado que um maior número de larvas de nematóide de galhas ocorre em plantas micorrizadas comparativamente às não micorrizadas e relatam este fato como sendo decorrente do aumento no sistema radicular promovido pelos fungos micorrízicos arbusculares em plantas micorrizadas (ATILANO et al., 1976).

Entre todos os parâmetros avaliados para determinar a ação nematóide do cisto da soja em plantas de soja micorrizadas, dois parâmetros são de especial importância: o número de fêmeas do NCS no sistema radicular das plantas e o número de cistos produzidos. Com relação ao número de fêmeas no sistema radicular, os valores não diferiram estatisticamente, porém, observou-se que o menor número de fêmeas foi encontrado em plantas micorrizadas com nível de inóculo do NCS de 500 ovos. O maior número de fêmeas foi observado em plantas não micorrizadas e com nível de inóculo de 4000 ovos do nematóide (T5). Neste nível de inóculo, a presença da micorriza favoreceu a diminuição do número de fêmeas no sistema radicular das plantas em 65%. Quanto ao número de cistos, observou-se maior reprodução do NCS em plantas com 4000 ovos do nematóide (T5 e T10). O número de cistos foi diminuído em 41% entre plantas micorrizadas e não micorrizadas com nível de inóculo de 2000 ovos do NCS. É interessante observar que as plantas micorrizadas e com 2000 ovos do NCS (T9), mesmo apresentando um dos maiores valores de fêmeas na raiz, conseguiram se desenvolver melhor que as demais plantas que foram inoculadas com o nematóide, indicando uma menor

severidade do ataque do patógeno. Isto já foi confirmado por outros autores como Grandison & Cooper (1986), que afirmam que os FMAs têm condições de diminuir a severidade do ataque de vários patógenos. O aumento na densidade da população de NCS foi observado neste trabalho e está de acordo com Tylka (1991), que afirma que a densidade da população do NCS geralmente é maior em locais colonizados com FMAs (Tabela 2).

O efeito estimulatório dos FMAs no crescimento das plantas de soja aparentemente resulta do aumento da nutrição com fósforo das plantas micorrizadas, porém, outros trabalhos indicam que a supressão do NCS pela presença dos FMAs ocorra devido a fenômenos biológicos e não ao aumento da nutrição por P, uma vez que altos níveis de fertilização com este elemento geralmente não afetam a população do nematóide (TYLKA et al., 1991; KELLAM & SCENCK, 1980). Essa supressão, segundo Tylka (1991), pode ser consequência da competição por nutrientes entre os organismos. Os FMAs dependem de fotossintatos do hospedeiro nos primeiros estágios do desenvolvimento para colonizar a raiz. Este período de intensa biossíntese dos FMAs pode coincidir com o período de estabelecimento inicial dos sítios de infecção do nematóide. Uma vez que o fungo requer no mínimo 10 dias para se estabelecer na raiz (KELLAM & SHENCK, 1980), uma insuficiência de nutrientes poderia resultar na diminuição da reprodução dos nematóides.

Alguns autores também relatam que a presença dos FMAs pode reduzir a habilidade do nematóide de penetrar na raiz, ou a presença do fungo pode influenciar sobre a formação, das células gigantes, interferindo no desenvolvimento do nematóide (KELLAM & SHENCK, 1980).

2.3.2 Ação do Fipronil na eclosão de juvenis do nematóide do cisto da soja

Vários produtos químicos têm sido testados para controle de nematóides. Entretanto ainda não foi estudada a ação do fipronil para esse controle. Nos resultados obtidos neste experimento, a porcentagem de eclosão de juvenis do nematóide do cisto da soja foi reduzida quando houve a aplicação de fipronil (Tabela 3). Por estes dados, pode-se observar que houve diferença entre o tratamento padrão sem o uso do produto químico e os demais tratamentos. Observou-se também que o uso de menor dose do fipronil já diminuiu em 50% a eclosão de juvenis do NCS (T5 e T2). Este resultado está de acordo com Rocha & Campos (2003), que estudando doses de Aldicarbe na eclosão de juvenis de *Meloidogyne*, observaram que a porcentagem de mortalidade na dose de 65 ppm do produto químico em comparação com a testemunha em água foi de 57%, após 24 h de exposição às soluções.

Tabela 3 –Percentagem de eclosão de juvenis do nematóide do cisto da soja eclodidos na presença do Fipronil, Santa Maria, 2004.

Tratamento	Eclosão de juvenis (%)
T1) 150 ml/ha*	16,5
T2) 20 ml/ha	33,5
T3) 40 ml/ha	34,4
T4) 600 ml/ha	8,8
T5) Testemunha	66,7

* Dosagem do fipronil utilizada nos tratamentos

A dosagem de fipronil recomendada para o controle de insetos varia de 20 ml/ha para controle de formigas (*Acromyrmex landolti landolti*) a 375 ml/ha para o controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*). A dosagem destes produtos também é objeto de pesquisa para a definição das melhores doses. A atividade dos produtos químicos no solo causa morte direta dos juvenis de *Meloidogyne*, inibe a eclosão, reduz a mobilidade dos J2 e provoca desorientação na penetração (FRANCO, 1992; GOURD et al., 1993). Na medida em que estas concentrações se reduzem por degradação ou lixiviação, estes efeitos tornam-se reversíveis (ROCHA & CAMPOS, 2003).

O fipronil parece ser um produto com alto potencial para o controle do nematóide do cisto da soja. Assim, mais estudos deverão ser realizados para se obter informações sobre as doses mais eficazes para o controle. Também é necessário realizar experimentos a campo para avaliar o grau de eficiência deste produto.

2.4 Conclusões

A inoculação das plantas de soja com *Glomus etunicatum* promoveu a diminuição do ataque do nematóide do cisto da soja.

O princípio ativo fipronil mostrou efeito positivo no controle da eclosão de juvenis do nematóide do cisto da soja.

Doses de 20 ml/ha do produto químico fipronil causaram uma diminuição em 33,5% na eclosão de juvenis do nematóide do cisto da soja.

2.5 Referências Bibliográficas

AMES, R.N.; REID, C.P.P.; INGHAM, E.R. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v. 96, p. 555-563, 1984.

ATILANO, R.A.; MENGE, J.A.; VAN GUNDY, S.D. Interaction between *Meloidogyne arenaria* and *Glomus fasciculatum* in grape. **Journal of Nematology**, v. 13, p. 52-57, 1981.

ATILANO, R.A.; RICH, J.R.; FERRIS, H.; MENGE, J.A. Effect of *Meloidogyne arenaria* on endomycorrhizal grape (*Vitis vinifera*) rootings. **Journal of Nematology**, v. 8, p. 278, 1976.

BAKKER, J. Current state of nematicides. **IN: Modern Crop Protection: Developments and Perspectives**, ed. JC Zadoks. Wageningen: **Wageningen Agric. Univ. Press**. p. 21-26, 1993.

BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. Eds. Mycorrhizae in sustainable agriculture. **Madison: America Society of Agronomy**, p. 45-70, 1992. (ASA. Special Publication 54).

CAMPOS, V.P.; CAMPOS, J.R.; SILVA, L.H.C.P.; DUTRA, M.R. Manejo de nematóide em hortaliças. **IN: SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: **UFLA**. p. 125-158, 2001.

CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Ver. Phytopathology**, v. 40, p. 221-249, 2002.

COFCEWICZ, E.; MEDEIROS, C.A.B.; CARNEIRO, R.; PIEROBOM, C. Interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* e os nematóides de galhas *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.26, n.1, 2001.

COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenylpyrazoli insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pest Biochemistry Physiology**, v. 46, p. 47-54, 1993.

COLLIOT, F.; KUKOWSKI, K.A.; HAWKINS, P.W.; ROBERTS, D.A. Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. Brighton Crop. Prot. Conf. **Pest Disease**, V. 1, p. 29-34, 1992.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO-RIO GRANDE DO SUL E SANTA CATARINA. Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Núcleo Regional Sul. 10ed. Porto Alegre, 400p, 2004.

COOK, R. Nature and inheritance of nematode resistance in cereals. **Journal of Nematology**, v. 6, p. 165-174, 1974.

COOK, R.; EVANS, K. Resistance and tolerance. **IN: BROWN, R.H.; KERRY, B.R. (eds). Principles and practice of nematode control in crops. Orlando, FL, Academic Press, p. 179-231, 1987.**

COOPER, K.M. Physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. **IN: POWELL, C.; BAGYARAJ, J. (ed). VA Mycorrhiza. Boca Raton, Florida: CRC Press. p. 155-186, 1984.**

COOPER, K.M.; GRANDISON, G.S. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizas with root-knot nematode on varieties of tomato and white clover susceptible to *Meloidogyne hapla*. **Annals of Applied Biology**, in press, 1986.

DEHNE, H.W. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 1115-1119, 1982.

DIEDERICHS, C. Interaction between five endomycorrhizal fungi and the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on chickpea under tropical conditions. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 64, p. 353-355, 1987.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: **Embrapa- SPI/ Embrapa- CNPS**, 412p., 1999.

FRANCO, J.F. Controle químico de fitonematóides. **Informe Agropecuário**, v. 16 (172): 1-2, p. 78-84, 1992.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, n.3, p. 484-500, 1980.

GOEDERT, W. J. Management of cerrado soils of Brazil: a review. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 34, p. 405-428, 1983.

GOURD, T.R.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R. Use of nematodes as biomonitors of nonfumigant nematicide movement through field soil. **Journal of Nematology**, v. 25 (1), p. 63-70, 1993.

GRACE, C.; STRIBLEY, D.P. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n.10, p. 1160-1162, 1991.

GRANDISON, G.S.; COOPER, K.M. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultivars of alfalfa susceptible and resistant to *Meloidogyne hapla*. **Journal of Nematology**, v. 18 (2), p. 141-149, 1986.

HAQ, S.; SAXENA, S.K.; KHAN, M.W. Toxicity of systemic nematicides in relation to larvae hatching and mortality of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Indian Journal of Parasitology**, v. 7 (2), p. 193-194, 1983. [Abstract].

KELLAM, M.K.; SCHENCK, N.C. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and root-knot nematode on soybean. **Phytopathology**, v. 70, p. 293-296, 1980.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, n. 4, p. 468-488, 1989.

LEHMAN, P.S.; HUISINGH, D.; BARKER, K.R. The influence of races of *Heterodera glycines* on nodulation and nitrogen-fixing capacity of soybean. **Phytopathology**, v. 61, p. 1239-1244, 1971.

LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effects. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, p. 366-371, 1988.

LINDERMAN, R.G. Vesicular arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. **IN: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G., Eds. Mycorrhizae in sustainable agriculture. Madison: America Society of Agronomy, p. 45-70, 1992. (ASA. Special Publication 54).**

LOPEZ, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A. M. L. O efeito de espécies de micorriza vesicular arbusculares no Sirato (*Macropodium atropurpureum*). **Bragantia**, Campinas, v. 39, p. 241-245, 1980.

LOPEZ, E. S.; SIQUEIRA, J.O. Vesicular-arbuscular mycorrhizas: their potential in phosphate nutrition in tropical regions. **IN: RUSSEL, R. S.; IGUE, K.; MEHTA, Y.R., Eds.** The soil-root system in relation to Brazilian agriculture. Londrina: **IAPAR**, p. 225-242, 1981.

MIRANDA, J.C.C.; MIRANDA, L. N. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares nativos de cerrado no crescimento de soja adubada com nitrogênio ou inoculada com *Rhizobium*. **IN: SIMPOSIO DO CERRADO, 8. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 1.** Brasília. Anais: Biodiversidade e produção sustentável de alimentos e fibras nos cerrados; Proceedings: biodiversity and sustainable production of food and fibers in tropical savannas. Planaltina: **EMBRAPA-CPAC**, p. 393-395, 1996.

NOVARETTI, W.R.T.; MONTEIRO, A.R.; FERRAZ, L.C.C.B. Controle químico de *Meloidogyne inognita* e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar com carbofuran e turbofos. **Nematologia Brasileira**, v. 22 (1), p. 60-74, 1998.

OSBORNE, P. The effect of aldicarbe on the hatching of *Heterodera rostochiensis* larvae. **Nematologica**, v. 19 (1), p. 7-14, 1973.

RIGGS, R. D.; SCHMITT, D.P. Nematodes. **IN: WILCOX, J.R. (ed).** Soybeans: Improvement, Production and uses. **American Society of Agronomy**, Madison, WI, p. 757-778, 1987.

RIGGS, R. D.; SCHMITT, D.P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Eaton Park, v.20, n.3, p.392-395, 1988.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de baixa dose de Aldicarbe nos processos de eclosão a penetração de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incógnita*. **Nematologia Brasileira**, v. 27 (2), p. 185-192, 2003.

RONCADORI, R.W.; HUSSEY, R.S. Interaction of the enomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* and root-knot nematode on cotton. **Phytopathology**, v. 67, p. 1507-1511, 1977.

SANCHES, P. A.; SALINAS, J.G. Low-input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. **Advances in Agronomy**, New York, v. 34, p.279-406, 1981.

SANCHES, P. A.; UEHARA, G. Management considerations for acid soils with high phosphorus fixation capacity. In: KHASAWNEH, F.E.; SAMPLE, E.C.; KAMPRATH, E.J., Eds. **The role of phosphorus in agriculture**. 2nd. Ed. Madison: American society of Agronomy/ Crop Science Society/ Soil Science Society of America, p. 471-514, 1986.

SCHENCK, N.C.; KELLAM, M.K. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on disease development. **Florida Agricultural Experimental Station Technical Bulletins 789**, 1978.

SCHENCK, N.C.; KINLOCH, R.A.; DICKSON, D.W. Interaction of endomycorrhizal fungi and root-knot nematode on soybean. IN: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (ed). *Endomycorrhizas*, London: **Academic Press**, p. 607-617, 1975.

STROBEL, N.E.; HUSSEY, R.S.; RONCADORI, R.W. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Meloidogine incognita*, and soil fertility on peach. **Phytopathology**, 72 p. 609-694, 1982.

THOMAS, W.B. Methyl bromite: effective pest management tool and environmental threat. **Supple Journal Nematology**, v. 28, p. 586-590, 1996.

TIHOHOD, D.; SANTOS, J.N. *Heterodera glycines*: Novo nematóide da soja no Brasil. Detecção e medidas preventivas. Jaboticabal, São Paulo, 23p., 1993.

TYLKA, G.L.; HUSSEY, R.S.; RONCADORI, R.W. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, phosphorus, and *Heterodera glycines* on soybean. **Journal of Nematology**, v. 23(1), p. 122-133, 1991.

WHITEHEAD, A.G. Plant- parasitic nematodes: their importance and control. **IN**: *Plant Nematode Control*, p. 1-12, Wallingford, UK: **CAB Int.**, 1997.

ZAMBOLIN, L.; SIQUEIRA, J.O. Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura. Belo Horizonte: **EPAMIG**, 36p, 1985. (EPAMIG. Documentos, 26).

CAPÍTULO III. PCR-ITS DO NEMATÓIDE DO CISTO DA SOJA RAÇA 3

3.1 Introdução

A utilização de variedades resistentes a raças de *Heterodera glycines* Ichinohe (NCS) é um dos mecanismos mais recomendáveis para áreas infestadas com esse nematóide. A identificação precisa de raças destes nematóides é fundamental para a seleção de variedades de soja a serem cultivadas.

A identificação correta da raça de NCS é um aspecto muito importante, tanto para testes de resistência em programas de melhoramento vegetal, como para a escolha de medidas de controle mais adaptadas a cada situação.

Os métodos usuais de identificação de espécies de nematóides são baseados em critérios morfológicos e bioquímicos. A morfologia é uma característica importante para a identificação, em muitos casos, pode proporcionar uma rápida e confiável caracterização. A identificação destes organismos é possível por testes em hospedeiros diferenciais, testes bioquímicos (serologia, eletroforese de proteínas totais, isoenzimas e focalização isoeletrica) e técnicas moleculares (Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição – RFLP, DNA-satélite, Reação de Polimerase em Cadeia – PCR, análise de restrição do DNA Ribossomal, Internal Transcribe Space - ITS, Intergenic Space – IGS, DNA Fingerprinting por PCR, DNA Polimórfico Amplificado Randômico – RAPD-PCR, PCR-arbitrário – AP-PCR, Fingerprinting de Amplificação de DNA – DAF e Polimorfismo de Fragmentos Amplificados – AFLP) (TENENTE & LEAL-BERTIOLI, 1999; MANSO, 1984). Contudo, estes métodos são muito trabalhosos e empregados geralmente para fêmeas. Para fins agrônômicos, o ideal seria dispor de um método de detecção rápido, aplicável a um só indivíduo, em qualquer estágio de desenvolvimento (RANDIG et al, 2004).

O uso de técnicas moleculares, através da análise de DNA, possui a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível. Estas técnicas não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do meio ambiente, ao estágio de desenvolvimento do nematóide e a outros fatores que possam afetar a morfologia do organismo (MANSO, 1984). Várias técnicas moleculares de DNA foram utilizadas na caracterização e diferenciação de espécies e raças dos gêneros *Bursaphelenchus*, *Ditylenchus*, *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne* e *Xiphinema* (CURRAN, 1991).

As primeiras técnicas de biologia molecular aplicada para nematóides fitopatogênicos envolvem a análise do polimorfismo de fragmentos obtidos pela digestão do DNA total com

enzimas de restrição (RFLPs) (CURRAN et al, 1985). Mas, foi somente devido à técnica de amplificação de DNA por PCR que uma melhor discriminação interespecífica pôde ser obtida, e que métodos de diagnóstico foram propostos, como por exemplo, a amplificação de regiões de DNA mitocondrial ou ribossômico (POWERS & HARRIS, 1993; PETERSEN et al, 1997). As técnicas de PCR permitem a amplificação de regiões específicas do genoma não conservadas (ITS- Internal Transcribed Spacer) localizadas entre regiões altamente conservadas. Este arranjo permite a construção de primers capazes de detectar estas regiões.

Para o nematóide do cisto da soja, a identificação é extremamente complexa, exigindo métodos práticos, sensíveis e precisos. Segundo Baldwin & Mundo-Ocampo (1991), o gênero *Heterodera* apresenta 25 espécies muito semelhantes morfológicamente que pertencem ao grupo *schachtii*. Atualmente, 11 raças estão descritas para o nematóide do cisto da soja existentes no Brasil (MENDES, 1993), sendo o método de análise por DNA o que permite diferenciá-las com maior rapidez e segurança. No entanto, apesar de existirem numerosas técnicas disponíveis (JONES, et al, 1997) para a identificação molecular de nematóides fitopatogênicos, os trabalhos se restringem, principalmente, a nematóides do gênero *Meloidogyne* sp, e poucos trabalhos do espécime *Heterodera glycines*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi agilizar um protocolo eficiente para extração de DNA dos cistos de *Heterodera glycines* e estudar via PCR-ITS a raça 3 do nematóide do cisto da soja.

3.2 Material e Métodos

3.2.1) Obtenção e manutenção da população do nematóide do cisto da soja raça 3

A raça três do nematóide do cisto da soja (NCS), *Heterodera glycines* (Ichnohe, 1952) utilizada neste estudo foi obtida junto à Embrapa/ CNPT/ Passo Fundo/ RS, através do Dr. Paulo Fernando Bertagnolli.

A população foi mantida em vasos de argila com capacidade de 5Kg em um substrato de solo e areia na proporção de 1:2. Nos vasos foi plantada soja cultivar Lee. Os vasos permaneceram na casa de vegetação do Departamento de Solos/ UFSM/ RS.

3.2.2) Extração do DNA

Para a extração do DNA foram utilizados cistos do NCS coletados do solo. A extração dos cistos se deu a partir de alíquotas de solo que foram suspensas em água e vertidas através de

peneiras de malha 25 e 100 mesh. O material retido na peneira de 100 mesh foi recolhido em papel toalha sobre placas de Petry e selecionado em microscópio estereoscópico com aumento de 20 vezes. Os cistos maiores e aparentemente viáveis foram escolhidos para a extração do DNA. Os procedimentos laboratoriais para extração de DNA ocorreram conforme recomendação de Sambrook et al (1989). Os cistos selecionados foram submetidos ao processo de extração de DNA, que constitui-se da maceração dos cistos em 600 µL de buffer CTAB com 20% de proteinase K (>20 unidades/ mg). As amostras depois de maceradas foram homogeneizadas em misturador por 1 min e incubadas em banho-maria a 65⁰C por 20 min. Após retiradas do banho-maria foi adicionado a elas 600 µL de fenol: clorofórmio: isoamyl álcool (25:24:1), e as amostras foram novamente submetidas à homogeneização em misturador por 5 min e centrifugadas a 18894 rcf, rotor 12130 por 8 min a 6⁰C, em centrífuga Sigma Laboratory Centrifuge 4K15. Depois da centrifugação das amostras o sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado 600 µL de fenol: clorofórmio: isoamyl álcool (25:24:1), e foi centrifugado a 18894 rcf por 8 min a 6⁰C. O sobrenadante foi, então, retirado e adicionado a um novo tubo contendo 400 µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas novamente em misturador e os tubos permaneceram em temperatura ambiente por 5 min. Após este período as mesmas foram centrifugadas a 18894 rcf por 5 min. Após este processo, descartou-se o líquido sobrenadante e inverteu-se o tubo por 5 min para retirar todo o isopropanol. Ressuspendeu-se o pellet com 100 µL de etanol gelado (70%) e as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 5 min. Após este tempo as amostras foram centrifugadas a 18894 rcf por 8 min. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se o etanol evaporar por 5 min. O pellet foi então ressuspensão em 50 µL de solução TE e armazenado a -20⁰C (CASWELL-CHEN et al., 1992).

3.2.3) Tratamento das amostras com RNase

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com RNase. Adicionaram-se às amostras 2 % do volume da amostra de RNase e as mesmas permaneceram em banho-maria a 37⁰C por 30 min.

3.2.4) Análise do produto em gel de agarose

O DNA extraído após ser submetido a tratamento com RNase foi analisado em gel de agarose 1%. O gel de agarose consiste de 100 ml de solução TBE (108g de tris, 55g de ácido bórico, 40 mL de EDTA 0,5 M, 1L de H₂O MiliQ, pH 8,0) e 1g de agarose. Essa mistura foi dissolvida em forno de microondas e ao esfriar adicionou-se a ela 0,5 µL de brometo de etídeo para visualização da presença de DNA. O gel foi corrido em cuba, em voltagem de 80

mV. Depois de realizada a corrida do gel, este foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado com câmara para fotografia de gel marca Kodac.

3.2.5) Reação de PCR

As amostras de DNA genômico foram submetidas a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) para a amplificação enzimática do DNA. Este processo ocorre *in vitro*, através de primers de oligonucleotídeos complementares às fitas opostas do DNA desejado. Os primers utilizados possuíam a seguinte seqüência de nucleotídeos ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS 4: TCCTCCGCTTATTGATATGC. A reação de PCR utilizada foi a seguinte: 1,0 µL de DNA; 2,5 µL de buffer de PCR; 3,5 µL de DNTP; 2,0 µL de MgCl₂; 3,0 µL do primer ITS1; 3,0 µL do primer ITS4; 0,5 unidades da enzima Taq polimerase (5 unidades/µL); 9,5 µL de água MiliQ. Os ciclos do PCR seguiram as seguintes condições: primeira extensão 94^oC por 3 min; desnaturação 94^oC por 45 s; anelamento 64^oC por 30 s; O número de ciclos foi de 30 ciclos seguidos por uma segunda extensão 72^oC por 10 min e mantidas a 4^oC até o momento da visualização do material no gel de agarose.

3.2.6) Caracterização genética do nematóide do cisto da Soja raça 3

Para diferenciação entre os isolados foi estudada a região do ITS (Internal Transcribe Space). O DNA amplificado foi novamente separado através de eletroforese em gel de agarose 1,2% e as bandas visualizadas com o brometo de etídio, conforme item 3.2.4.

3.3 Resultados e Discussão

Para estudo em nível de DNA foi extraído o DNA dos cistos (Figura 1) da raça 3 (Figura 2). Após serem testados vários métodos de extração, o método de Caswell-Chen et al. (1992) mostrou ser o mais eficiente e ágil para a extração do DNA.

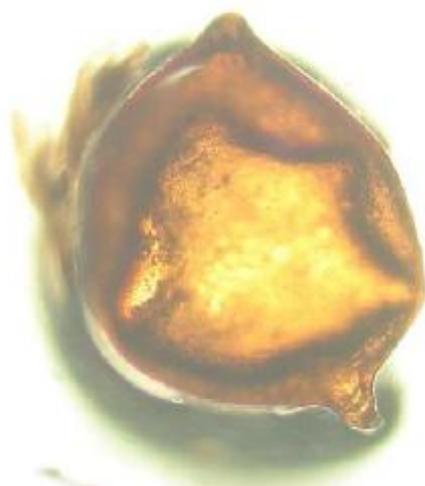


Figura 1– Cisto do nematóide do cisto da soja, Santa Maria, RS, 2004.

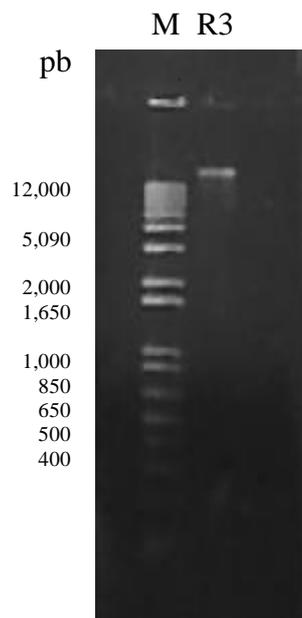


Figura 2– DNA genômico de nematóide do cisto da soja raça 3 (R3). Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco (M), Santa Maria, RS, 2004.

No estudo do PCR-ITS, pode-se observar que o PCR gerou fragmentos de tamanho aproximado de 650 pares de bases para a raça 3 do NCS (Figura 3).

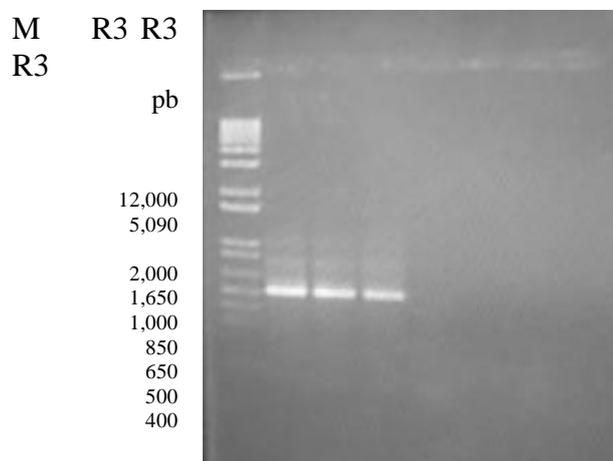


Figura 3– Produto de PCR-ITS do nematóide do cisto da soja raça 3 (R3). Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco (M), Santa Maria, RS, 2004.

O uso da região do ITS tem sido uma ferramenta poderosa para a caracterização e identificação de espécies, principalmente quando a identificação morfológica deixa dúvidas. Assim, mais estudos devem ser realizados a fim de poder se obter padrões das populações e/ou raças presentes nos municípios estudados no estado do Rio Grande do Sul. Contudo, é importante salientar que nenhuma técnica isolada é satisfatória e que se deve utilizar todos os recursos possíveis para a caracterização e diferenciação das raças do nematóide do cisto da soja.

3.4 Referências Bibliográficas

CASWELL-CHEN, E.P.; WILLIAMSON, V.M.; WU, F.F. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Heterodera cruciferae* and *H. schachtii* populations. **Journal of Nematology**, v. 24, p. 343-351, (1992).

CURRAN, J.; BAILLIE, D.L.; WEBSTER, J.M. Use of restriction fragments length differences in genomic DNA to identify nematode species. **Parasitology**, v. 90, p. 137-144, 1985.

CURRAN, J. Application of DNA analysis to nematode taxonomy. IN: NICKLE, W.R. (ed). **Manual of Agricultural Nematology**. New York. Marcel Dekker, Inc. p. 125-143, 1991.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALA, F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; BRETTSCHEIDER, A.; BETTINI, R.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381-390, 1997.

MANSO, S.B.G.; TENENTE, R.C.V. Nematóide (*Heterodera glycines* Ichinohe) formador de cisto da soja. Brasília, DF: **EMBRAPA-CENARGEM** (Comunicado técnico), p. 5, 1984.

MENDES, M.L. O nematóide do cisto da soja (NCS) e a sojicultura brasileira: situação atual. **Fitopatologia Brasileira**, E18: 254, 1993.

PETERSEN, D.J.; ZIJLSTRA, C.; BLOK, V.; VRAIN, T.C. Species probes efficiently distinguish root-Knot nematodes species using signatures in the ribosomal intergenic spacer. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 20, p. 619-626, 1997.

POWERS, T.O.; HARRIS, T.S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v. 25, p. 1-6, 1993.

RANDIG, O. CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SEVERO, P. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em Multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, v. 28 (1), p. 1-10, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

TENENTE, R.C.V.; LEAL-BERTIOLI, S.C. de M. Técnicas bioquímicas e moleculares na diagnose de fitonematóides. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1999, 37p. Boletim de Pesquisa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos neste estudo pode-se considerar que:

- Estudos a campo devem ser feitos para avaliar a capacidade de supressão dos fungos micorrízicos arbusculares na reprodução do nematóide do cisto da soja. Se esta supressão for possível a campo, práticas culturais podem ser sugeridas para promover o favorecimento da comunidade destes fungos no solo, resultando em uma diminuição dos níveis de parasitismo do nematóide do cisto da soja, bem como no aumento da produção de soja;

- Estudos com outras espécies de fungos micorrízicos arbusculares e com diferentes doses de inóculo do fungo deverão ser realizados com o objetivo de avaliar o potencial de controle dos diferentes fungos e melhor dose de inóculo para que ocorra o controle;

- Estudos com doses do fipronil, em casa de vegetação, para avaliar o potencial de controle do nematóide do cisto da soja, devem ser realizados;

- Aplicações das séries diferenciadoras de raças e extração do DNA das populações coletadas no campo são necessárias para que se identifique a raça dos nematóides do cisto da soja que estão ocorrendo nestas áreas;

- A partir do conhecimento das populações de nematóides que ocorrem em diferentes ambientes será possível caracterizá-las geneticamente e saber qual o nível de diferenciação destas populações. Isto contribuirá para que o desenvolvimento de cultivares resistentes seja mais específico para cada região dependendo da população de nematóides predominante no local. Assim será possível avaliar se as raças inoculadas nos hospedeiros diferenciadores apresentam variabilidade genética no que concerne ao DNA.