

Avaliação de Diferentes Métodos para Extração de Cistos de *Heterodera glycines* de Amostras de Sementes de Soja

Renata C.V. Tenente¹, Vilmar Gonzaga¹ & Lenisa Vilas-Boas^{1,2}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C. Postal 02372, Brasília (DF) Brasil.

²Bolsista do CNPq.

Autor para correspondência: renata@cenargen.embrapa.br

Recebido para publicação em 12/01/2007. Aceito em 21/05/2007.

Resumo - Tenente, R.C.V., V. Gonzaga & L. Vilas-Boas. 2007. Avaliação de diferentes métodos para extração de cistos de *Heterodera glycines* de amostras de sementes de soja.

Exemplares de *Heterodera glycines*, o nematóide dos cistos da soja (NCS), podem estar associados às sementes usadas em intercâmbio de material vegetal e serem disseminados dessa forma para áreas ainda indenadas. Portanto, os métodos usados para a extração de cistos foram aferidos em estudo comparativo, com a finalidade de melhorar a eficiência de detecção deste nematóide. O ensaio constou de 12 tratamentos, com cinco repetições. Os métodos usados foram: peneiramento a seco, técnica de Fenwick e flutuação de cistos, com variações de 2, 4, 8, 16 e 25 cistos, misturados a 50 sementes de soja em cada repetição. Como foi verificado, nesse primeiro experimento, que o método do peneiramento a seco foi o mais eficiente, foi reavaliado num segundo experimento, variando a quantidade de sementes (50; 100; 200; e 400), infestadas com dois cistos. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos, concluindo-se assim que o peneiramento a seco é um método que pode ser recomendado na inspeção de sementes de soja visando à detecção de eventuais cistos de *H. glycines*.

Palavras-chaves: nematóide dos cistos, detecção, sementes, *Glycine max*.

Summary - Tenente, R.C.V., V. Gonzaga & L. Vilas-Boas. 2007. Evaluation of different methods of cyst extraction of *Heterodera glycines* from soybean seed samples.

Specimens of *Heterodera glycines*, soybean cyst nematode (SCN), can be associated with soybean seeds used in plant material exchange and they can be disseminated into free areas. Therefore, the used methods for cyst extraction were gauged by a comparative study, to improve of the efficiency of nematode detection. This trial included 12 treatments with five replicates. The used methods were: dry sieving, Fenwick technique and cyst flotation with 2, 4, 8, 16 and 25 cysts mixed with 50 soybean seeds for each replicate. It was verified, in the first experiment, that the dry sieving method was the most efficient and this was re-evaluated in the second experiment, in which different amount of seeds (50; 100; 200 and 400) infested with two cysts were used. There were not significant differences among treatments, concluding that the dry sieving method is a method that can be recommend for the detection of *H. glycines* cysts on soybean seeds.

Keywords: cysts nematode, detection, seeds, *Glycine max*.

Introdução

No Brasil, os danos de nematóides à cultura da soja passaram a receber maior atenção a partir da detecção do nematóide de cisto da soja (NCS), *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, na safra 1991/92 (Monteiro & Moraes, 1992; Lima *et al.*, 1992; Lordello

et al., 1992). A partir de então, a sojicultura brasileira passou a ser seriamente ameaçada, devido à rápida disseminação deste parasita no país e às expressivas reduções na produção ocorridas, representadas por perdas que variam de 4,8 % a 11 % (Silva *et al.*, 2003). A variabilidade genética entre populações do NCS

constitui uma das principais dificuldades no controle desse parasita, devendo, necessariamente, ser identificado através de hospedeiros diferenciais e de técnicas moleculares.

O NCS está presente na maioria dos estados brasileiros produtores de soja. Das 16 raças de *H. glycines* já relatadas, no Brasil já foram detectadas onze, a saber: raça 1, 2, 3, 4, 4⁺, 5, 6, 9, 10, 14 e 14⁺ (Noel *et al.*, 1994; Wain & Silva, 1996; Dias *et al.*, 2007). Contudo, apenas em MS, MT e GO existem muitas raças desse nematóide (Dias *et al.*, 2007). O desenvolvimento de uma nova cultivar resistente a esse nematóide pode, em certos casos, ficar comprometido caso uma nova raça esteja presente na área. Contudo, essa determinação de raça pelo método tradicional é impraticável, por demandar grande espaço em casa-de-vegetação e laboratório, bem como maior período de tempo e mais mão de obra. Portanto, faz-se necessário o aprimoramento dos métodos de detecção dos cistos, uma vez que o intercâmbio de germoplasma vegetal no Brasil desempenha importante papel no incremento da variabilidade genética de plantas, junto aos programas de melhoramento genético. A introdução desse material poderá ocasionar a entrada no país de novas raças de *H. glycines* de importância econômica e quarentenária. Além das raças de *H. glycines* que não existem no Brasil, há outras espécies de nematóides de cistos que podem acompanhar as sementes de soja, tais como *H. cajani* (Kundu & Mishra, 1993); *H. goettingiana*; *H. ciceri* e *H. schachtii* (Goodey *et al.*, 1965). Para minimizar tais riscos, faz-se necessário lançar mão de medidas quarentenárias que incluam as análises fitossanitárias, através de métodos acurados e eficientes.

A extração de cistos de *Heterodera* pode ser feita com eficiência com a flutuação dos cistos em água e recuperação em peneira de 100 µm de malha, suficiente para capturar cistos pequenos como os de *H. trifolii* (Hooper *et al.*, 2005). Alternativamente, a suspensão oriunda da flutuação dos cistos pode ser passada em papel de filtro colocado em um funil, onde a água da suspensão é drenada e o papel úmido é examinado para presença de cistos (Shepherd, 1986).

Outro método usado na extração de cistos é o de Fenwick (1940), que passou por modificações como relatado por Oostenbrink (1960). Entretanto, segundo

Riggs *et al.* (1997), a flutuação combinada com o peneiramento é muito mais eficiente. Mas Hooper *et al.* (2005) alertaram que os cistos recuperados por esse método poderiam conter ovos que não sobreviveriam à dessecação e isto seria um problema para usá-los em experimentos de bioensaio. Como o principal propósito do presente trabalho é a detecção de cistos com maior eficiência e sabe-se que mesmo os cistos vazios recuperados permitem a identificação da espécie pelo padrão perineal dos mesmos, tal desvantagem deixa de ter maior relevância.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de três métodos de extração de cistos de *H. glycines*, bem como avaliar o método do peneiramento a seco na recuperação de cistos, em relação a diferentes quantidades de sementes de soja.

Material e Métodos

Primeiro experimento. O ensaio constou de 15 tratamentos, com cinco repetições, comparando-se três métodos e utilizando-se variações nos números de cistos iniciais. Os métodos usados foram: peneiramento a seco (Gonzaga *et al.*, 2000; Tenente *et al.*, 2000); elutriador de Fenwick (Zuckerman *et al.*, 1990); flutuação de cistos (Carvalho *et al.*, 1953); com as variações de 2, 4, 8, 16 e 25 cistos misturados a 50 sementes de soja (cultivar Cristalina) por repetição. Os cistos de *H. glycines* utilizados neste trabalho foram fornecidos pela Embrapa Soja.

Os procedimentos referentes aos tratamentos estão descritos a seguir: **a) peneiramento a seco** (Figura 1): primeiramente, colocaram-se as sementes infestadas sobre uma tela de metal de 2 mm de porosidade, que substituiu o fundo de uma caixa tipo *gerbox* de plástico, medindo 11 x 11 cm, sobreposta a uma tampa desta caixa. Entre a tela de metal e a tampa da caixa *gerbox*, colocou-se papel mata borrão umedecido. Em seguida, agitou-se manualmente a caixa *gerbox* por aproximadamente um minuto, para permitir a passagem dos cistos pelos poros da tela, ficando esses retidos no papel umedecido. Em seguida, as amostras foram analisadas sob estereoscópio, para contagem dos cistos recuperados. **b) elutriador de Fenwick** (Figura 2): colocaram-se as sementes infestadas em uma peneira de 2 mm de porosidade sobre o elutriador de Fenwick e procedeu-se a

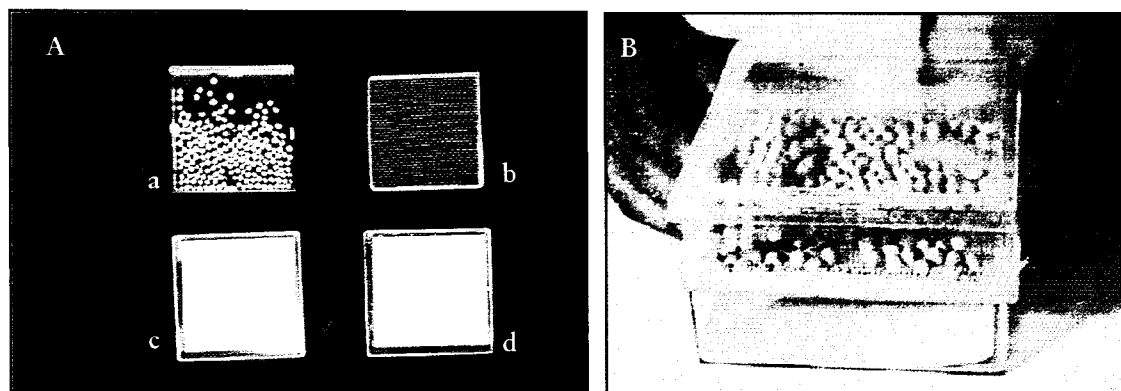


Figura 1 - Peneiramento a seco: A) materiais para extração de cistos (a - gerbox com sementes, b- tela de retenção das sementes, c- tampa da gerbox com papel de filtro, d- tampa com o papel de filtro após peneiramento); B) vista da montagem do método de extração de cistos.

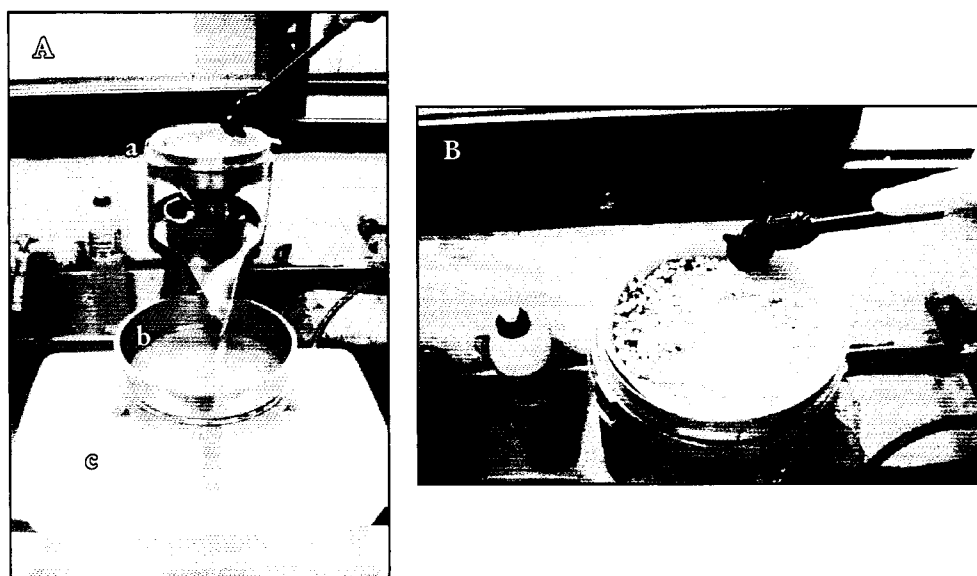


Figura 2 - Extração de cistos pelo método de Fenwick: A) materiais usados na extração [a - peneira (2 mm de porosidade), b- aparelho de Fenwick, c- peneira (0,149 mm de porosidade) posicionada na base do aparelho; B) foto aproximada da lavagem do material com uso do chuveiro.

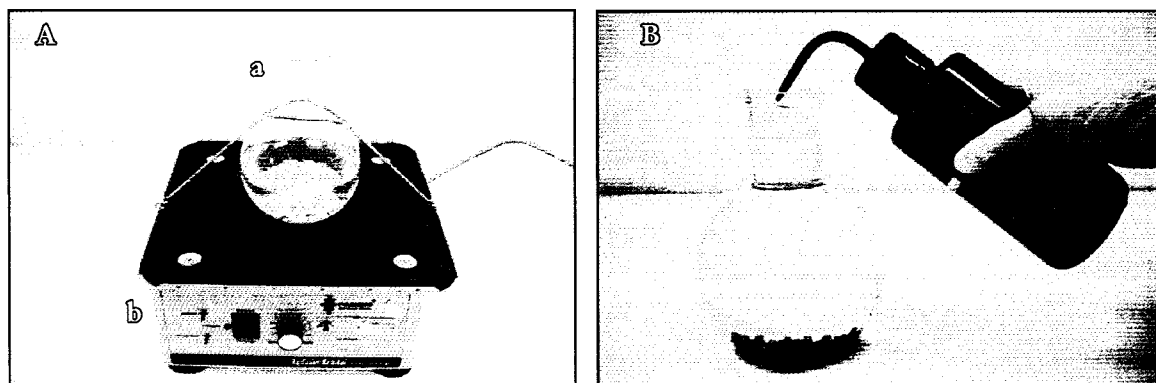


Figura 3 - Flutuação de Cistos: A) materiais usados na extração (a - balão de vidro, b- agitador); B) foto da última etapa da extração, com uso da pipeta para completar o volume do balão.

sucessivas lavagens, com jato de água de torneira, através de um chuveiro. Os cistos foram recolhidos em uma peneira de 0,149 mm de porosidade, posicionada na base do aparelho. A seguir, colocou-se o material coletado em caixa *gerbox* de plástico (11 x 11 cm), contendo papel de filtro umedecido, e observou-se diretamente ao estereoscópio, para verificar a presença de cistos. **b) flutuação de cistos** (Figura 3): cada amostra de sementes infestadas foi colocada em um balão de vidro de fundo chato, de capacidade de 1 litro, contendo 500 ml de água destilada, e levada ao agitador de Kline (Fanem modelo 256) por 10 minutos. A seguir, adicionou-se uma solução de sacarose (500g de sacarose/ litro de água) mais *Separan*, um flocculante, na concentração de 12,5 ppm até a parte inferior do gargalo do balão de vidro, e agitou-se por mais 10 minutos. Em seguida, completou-se o volume com a solução de sacarose até o início do gargalo do balão. Deixou-se em repouso por mais 10 minutos. O volume total do balão foi completado com água destilada, utilizando-se uma pisseta. Verteu-se então, de forma contínua, um terço dessa suspensão em funil de Buckener, contendo uma folha de papel de filtro. Preparou-se mais de um funil para cada amostra, para evitar o transbordamento da solução e conseqüentemente perda de material, pois pode ocorrer o entupimento do funil devido principalmente aos fragmentos das sementes. O papel de filtro foi retirado ainda molhado, após escoamento de toda a solução. A seguir, o mesmo foi examinado ao estereoscópio para verificar a presença de cistos.

Segundo experimento. O método usado neste experimento foi o do peneiramento a seco, descrito

anteriormente, variando-se o número de sementes de soja por repetição: 50 (padrão), 100, 200 e 400, misturadas a dois cistos de *H. glycines*, com cinco repetições, por tratamento. Após a execução dos métodos, as amostras foram analisadas sob estereoscópio e determinou-se o número de cistos recuperados, separadamente para cada repetição e cada tratamento (número diferenciado de sementes).

Análise dos dados. Foram feitas análises estatísticas para ambos os experimentos, sendo que no primeiro somente foi realizada a comparação do número de cistos iniciais na infestação das sementes. No segundo experimento, foi feita a análise de variância, com a comparação das médias, segundo o teste de Dunnet, que comparou cada tratamento com o padrão (50 sementes).

Resultados e Discussão

Os resultados do primeiro experimento encontram-se na Tabela 1. O método do peneiramento a seco foi o mais eficiente, com 100% de recuperação, quando se utilizaram dois e quatro cistos na infestação inicial. Entretanto, quando se aumentou o número inicial de cistos, mantendo-se a mesma quantidade de sementes, a eficiência do método caiu gradativamente, com variação de redução de 2,5 a 40 %, para infestações iniciais de 8 e 25 cistos, respectivamente.

Os métodos de Fenwick e de flutuação de cistos apresentaram baixa eficiência na recuperação dos cistos, quando se utilizaram na infestação inicial das sementes as quantidades de 16 e 25 cistos (Tabela 1).

Observou-se que a eficiência dos métodos foi menor à medida que se aumentou o número inicial de

Tabela 1 - Percentagem de cistos de *Heterodera glycines* recuperados em 50 sementes de soja cv. Cristalina utilizando-se três métodos de extração.

Número de cistos inoculados	Peneiramento a seco	Técnica de Fenwick	Flutuação de cistos (balão)
	Cistos recuperados (%)*		
2	100	80	90
4	100	100	85
8	97	92	80
16	91	28	32
25	60	50	5

*Média de cinco repetições.

Tabela 2 - Número de cistos de *Heterodera glycines* recuperados de sementes de soja cv. Cristalina utilizando-se o método do peneiramento a seco.

Número de sementes	Número de cistos inoculados	Número de cistos recuperados*
50	2	1,8a
100	2	2,0a
200	2	1,8a
400	2	1,8a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Dunnet.

cistos por lote de sementes, sendo que o peneiramento a seco apresentou uma redução menos acentuada na recuperação dos cistos, quando comparado aos outros dois métodos. Verificou-se uma alta eficiência para qualquer dos métodos utilizados nas análises de sementes de soja, principalmente quando o número de cistos por amostra foi menor, 2 ou 4 cistos iniciais. Contudo, pode-se recomendar a utilização do método do peneiramento a seco para detecção de cistos de *H. glycines*, pois este método demonstrou maior percentagem de recuperação independente do número de cistos associados às sementes de soja.

Foi realizada uma análise geral, para os três métodos estudados, de comparação entre números de cistos iniciais. Os resultados em sua maioria, foram altamente significativos, fazendo exceção à comparação de 16 x 8 cistos e/ ou vice versa, 8 x 16 cistos. Portanto, o número inicial de cistos associados a um lote de sementes foi significativo independentemente do método usado para extração.

No segundo experimento, verificou-se que o método do peneiramento a seco foi altamente eficiente na recuperação dos cistos em todos os tratamentos, independente da quantidade de sementes utilizadas, não ocorrendo diferenças significativas (probabilidade de erro de 1 %) entre os tratamentos (Tabela 2).

Portanto, os resultados destes experimentos concordam com os de relatos anteriores (Riggs *et al.*, 1997; Hooper *et al.*, 2005) mostrando que o peneiramento é um dos mais eficientes métodos para extração de cistos. Ainda, os resultados deste trabalho mostraram que os métodos usados para extração de cistos do solo, como mencionados por Shepherd (1986); Fenwick (1940) e Oostenbrink (1960), podem ser usados na extração de cistos aderentes as sementes de soja, com eficiência significativa na recuperação dos mesmos.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao pesquisador João Flávio Veloso Silva e Waldir Pereira Dias, da Embrapa Milho e Sorgo e Embrapa Soja, respectivamente, pelo fornecimento dos cistos de *Heterodera glycines* utilizados neste trabalho.

Literatura Citada

- CARVALHO, J.C., L.G.E. LORDELLO & O.J. BOOCK. 1953. Considerações acerca do nematóide dourado da batatinha. *O Biológico*, 19:196-200.
- DIAS, W.P., N.R. RIBEIRO, I.O.N. LOPES, A. GARCIA, G.E.S. CARNEIRO & J.F.V. SILVA. 2007. Manejo de nematóides na cultura da soja. ANAIS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXVII, Goiânia. Anais, p. 26-30.
- FENWICK, D.W. 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18: 155-172.
- GOODEY, J.B., M.T. FRANKLIN & D.J. HOOPER. 1965. The Nematode Parasites of Plants Catalogued under their Hosts. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal (UK). 214 p.
- GONZAGA, V., R. TENENTE & M. PRATES. 2000. Eficiência do método de peneiramento a seco na detecção de cistos de *Heterodera glycines* em sementes de soja. *Fitopatologia Brasileira*, 25 (suplemento): 337.
- HOOPER, D.J., J. HALLMANN & S.A. SUBBOTIN. 2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In: LUC, M., R.A. SIKORA & J. BRIDGE (ed). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford (UK). p. 53-86.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, 48 (9): 692.
- KUNDU, G.G. & S.D. MISHRA. 1993. Efficacy of granular insecticides against stem fly and nematode infestations in soybean with *Rhizobium* inoculant. *Indian Journal of Entomology*, 55 (3): 225-228.
- OOSTENBRINK, M. 1960. Estimating nematode populations by some selected methods. In: SASSER, J.N. & W.R. JENKINS (ed). *Nematology Fundamentals and Recent Advances with Emphasis on Plant-parasitic*

- and Soil Forms. University of North Carolina Press, Chapel Hill (USA). p. 85-102.
- RIGGS, R.D, D.P. SCHMITT & A. MAUROMOUSTAKOS. 1997. Comparison of extraction and shipping methods for cysts and juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 7: 54-59.
- SHEPHERD, A.M. 1986. Extraction and estimation of cyst nematodes. In: SOUTHEY, J.F. (ed). *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. HMSO, London. p. 31-49.
- SILVA, J.F.V., A. FRANCISCO, C.G. LIMA, G.E.S. CARNEIRO, M.S. ASSUNÇÃO, J. NUNES JÚNIOR, P.M.F.O. MONTEIRO, R.A.S. KIIHL, L.A. ALMEIDA, P.I.M. SOUZA, W.P. DIAS, A. GARCIA, E. OLIVEIRA & W.P. CAYRES. 2003. BRSGO Chapadões: cultivar de soja com resistência as raças 1; 3; 4 e 14 de *Heterodera glycines*. *Nematologia Brasileira*, 27 (2): 245.
- TENENTE, R.C.V., V. GONZAGA, L.V. BOAS & M. PRATES. 2000. Uma metodologia promissora para detecção de cistos em sementes. *Fitopatologia Brasileira*, 25 (suplemento): 341.
- TENENTE, R.C.V., E.S.B.G.C. MANSO, M.A.S. MENDES & A.S.A. MARQUES. 1994. Seed Health Testing for Nematode Detection of Plant Germplasm by CENARGEN. *Seed Science Technology*, 22 (3): 415-420.
- WHITEHEAD, A.G. & J.R. HEMMING. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55: 25-38.
- ZUCKERMAN, B.M., W.F. MAI & L.R. KRUSBERG. 1990. *Plant Nematology: Laboratory Manual*. University of Massachusetts Agricultural Experiment Station. 252 p.
- ZUCKERMAN, B.M., W.F. MAI & M.B. HARRISON. 1985. *Plant Nematology: Laboratory Manual*. University of Massachusetts Agricultural Experiment Station. 212 p.