

## Comparação entre técnicas de coloração de raízes de soja infectadas por *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*

Fernando Godinho de Araújo<sup>1</sup>, Kássia Aparecida Garcia Barbosa<sup>2</sup>, Leonardo de Castro Santos<sup>3</sup>, Renato Andrade Teixeira<sup>4</sup>, Mara Rubia da Rocha<sup>4</sup>

### RESUMO

Conduziu-se experimento em casa de vegetação para avaliar a eficiência de duas técnicas de coloração de raízes de soja cultivar Emgopa 313, infectadas pelos três principais fitonematóides que afetam a cultura: *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*. Foram realizadas três avaliações aos 10, 17 e 25 dias após o plantio da soja em solo naturalmente infestado, com os nematóides avaliados. A técnica empregando clareamento com NaOCl e fucsina ácida e a técnica que emprega lacto-glicerol e fucsina ácida foram eficientes na coloração dos nematóides, permitindo a sua visualização no interior do tecido radicular. Em função da duração do ciclo de vida do *P. brachyurus* não foi possível a visualização desses nematóides nos tecidos radiculares na primeira avaliação empregando a técnica do clareamento e coloração com fucsina ácida, e na segunda avaliação, em ambas as técnicas testadas. Para tecidos mais tenros a técnica que emprega o clareamento seria a mais indicada por facilitar a visualização dos nematóides, já que os tecidos sofrem certa descoloração, e por utilizar uma menor quantidade de corante, o que auxilia no processo de descoloração.

**Palavras-chave:** *Glicine max*, nematóide de cisto da soja, nematóide de galhas, nematóide das lesões radiculares

## Comparison of staining methods of root of infested soybean by *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus brachyurus*

### ABSTRACT

Experiment was conducted in a greenhouse with the purpose to evaluate the effectiveness of two root staining techniques on soybean cultivar Emgopa 313, infected by the three main nematodes of the crop: *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus brachyurus*. Three evaluations were performed at 10, 17 and 25 days after planting in naturally infested soil. The technique using bleaching with NaOCl and acid fuccin and the technique that employs lacto-glycerol and acid fuccin were both effective in staining nematodes, allowing its observation in the root tissue. Because of longer duration of the life cycle of *P. brachyurus* it was not possible to view these nematodes in root the tissue at the first evaluation using the technique of bleaching and staining with acid fuccin, and at the second evaluation using both techniques. For young tissues the technique that employs bleaching is more indicated to facilitate the nematode observation, since it uses less stain which helps the process of discoloration.

**Keywords:** *Glicine max*, root-knot nematode, soybean cyst nematode, lesion nematode.

---

**Autor para correspondência:** Fernando Godinho de Araújo  
Rodovia Geraldo Silva Nascimento, km 2,5, s/n, Zona Rural, Urutaí, GO, Brasil.  
E-mail: fernando.godinho@ifgoiano.edu.br  
**Recebido em:** 01 março 2015  
**Aceito em:** 23 março 2015

<sup>1</sup>Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas de Goiatuba, Goiatuba, GO, Brasil

<sup>3</sup>Instituto Federal Goiano – Câmpus Iporá, GO, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

## INTRODUÇÃO

A coloração de nematóides dentro do tecido radicular é uma rotina nos laboratórios de nematologia de todo o mundo. A capacidade de visualização do nematóide dentro do tecido radicular é essencial para muitas áreas de investigação nematológica, como a avaliação de resistência de plantas, elucidação do desenvolvimento e ciclo dos nematóides e avaliação da eficiência do controle utilizando nematicidas tradicionais ou o biocontrole (Thies et al. 2002).

Vários procedimentos de coloração de tecido vegetal têm sido desenvolvidos e utilizados em laboratórios de nematologia de plantas (McBeth et al. 1941, Fenner 1962; Southey 1970, Holbrook et al. 1983, Byrd et al. 1983, Tihohod 1993). A fucsina ácida é, sem dúvida, o corante mais utilizado para a coloração de nematóides dentro do tecido radicular. Uma das primeiras técnicas de coloração de raízes a ser empregada foi a técnica utilizando fucsina ácida associada ao lactofenol (McBeth et al. 1941). No entanto, este método de coloração é extremamente perigoso devido à utilização de substâncias tóxicas derivadas do fenol. Byrd et al. (1983) desenvolveram uma metodologia aperfeiçoada para coloração de nematóides em tecido radicular, que combina vários métodos incluindo a limpeza das raízes, com NaOCl, a coloração dos nematóides com fucsina ácida, e a descoloração das raízes com glicerina acidificada.

As técnicas de coloração de raízes são bastante empregadas para diversas culturas de interesse agrônomo, dentre elas, a cultura da soja. Com relação às investigações ligadas a essa leguminosa, a coloração de raízes é utilizada principalmente no estudo da penetração dos principais fitonematóides que infectam o sistema radicular da cultura (Diogo et al. 1999, Asmus et al. 2001).

Este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de duas técnicas de coloração de raízes infectadas por *Heterodera glycines* Ichinohe 1952; *Meloidogyne incognita* Chitwood 1949; e *Pratylenchus brachyurus* Filipjev e Schuurmans Stekhoven 1941.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada como hospedeira uma cultivar de soja (*Glycine max* L.) considerada suscetível aos três gêneros de nematóides testados, Emgopa 313, que foi semeada em vasos com capacidade para 1,5 L. Os vasos, que continham solo naturalmente infestado com *H. glycines*, *M. incognita* e *P. brachyurus*, cultivados sequencialmente para multiplicação dos nematóides, foram semeados com a cultivar de soja e mantidos em condições de casa de vegetação na Escola de Agronomia e

Engenharia de Alimentos da UFG. As plantas foram conduzidas por períodos de 10, 17 e 25 dias após o que, foram retiradas quatro plantas de um vaso e levadas ao laboratório de Nematologia para serem submetidos às técnicas de coloração. No laboratório as raízes foram lavadas em água corrente, para retirada do solo aderido ao tecido radicular. Em seguida foram seccionadas em fragmentos de, aproximadamente, dois centímetros e submetidas a duas técnicas.

Na primeira técnica testada, utilizou-se NaOCl e fucsina ácida (Byrd et al. 1983). Os fragmentos radiculares foram embebidos, por quatro minutos, em uma solução a 1,5% de NaOCl, sendo posteriormente drenados e lavados para retirar todo o hipoclorito de sódio, e permaneceram embebidos em água por quinze minutos. Em seguida, adicionou-se uma gota de corante em cerca de trinta mililitros de água e levou o material a ferver. O corante foi preparado diluindo-se 3,5 g de fucsina ácida em 250 ml de ácido acético (99,7%) e 750 ml de água destilada. Após a fervura, por aproximadamente trinta segundos, os fragmentos radiculares foram drenados, deixados esfriar para evitar a formação de bolhas dentro do tecido radicular, e lavados em água corrente, para retirar o excesso de corante. Em seguida foram colocados para clarear em glicerina acidificada com duas gotas de ácido clorídrico e levados a ferver. Após o clareamento, os fragmentos foram colocados em glicerina e armazenados em geladeira até a montagem das lâminas.

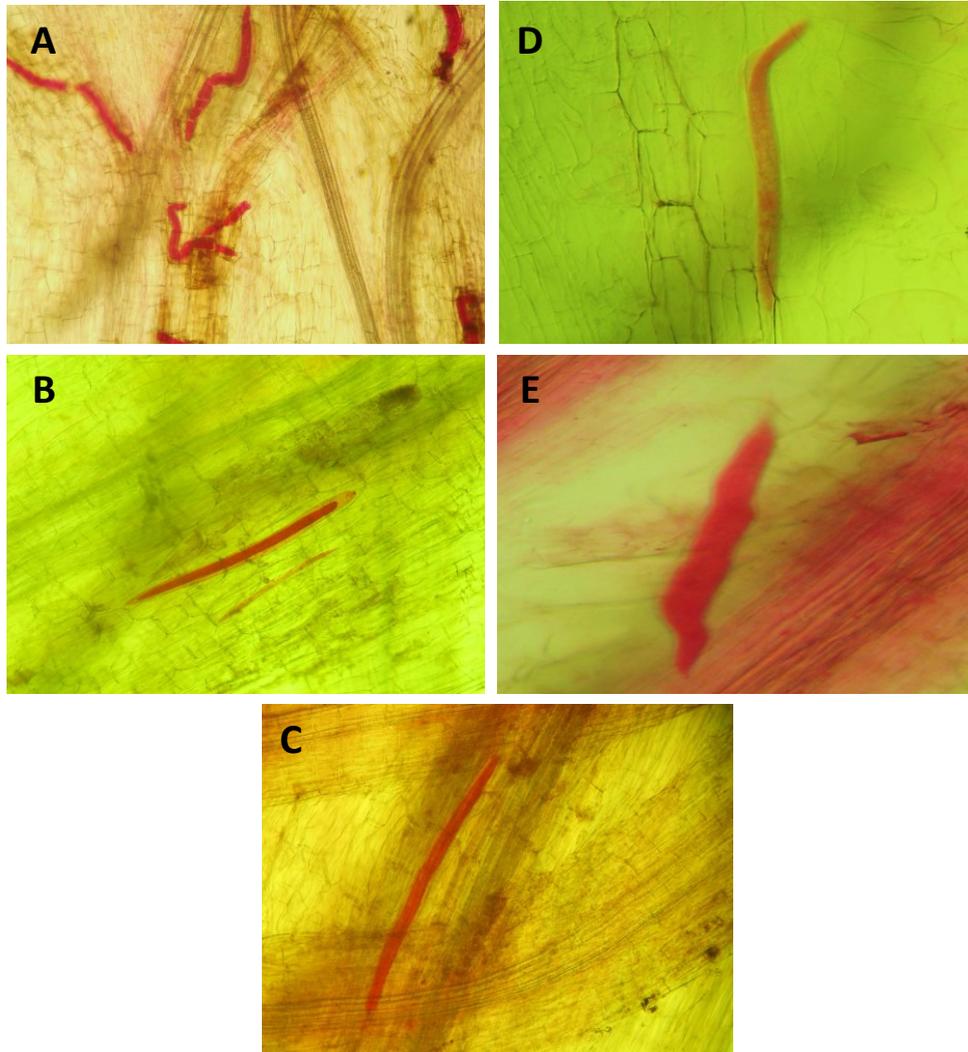
Na segunda técnica de coloração testada, utilizou-se lacto-glicerol e fucsina ácida (Tihohod 1993). Os fragmentos radiculares, após a devida lavagem, foram aquecidos, até a fervura, por aproximadamente três minutos, em uma solução contendo lacto-glicerol e o corante. A solução utilizada para fervura do material foi preparada com a adição de 10 ml de corante a 1% (diluição de 1 g de fucsina ácida em 100 ml de água destilada) e de 100 ml da solução de lacto-glicerol (40 g ácido láctico 45% + 80 g glicerina + 40 ml água destilada). Em seguida, os fragmentos foram lavados em água corrente, após esfriar à temperatura ambiente, para retirar o excesso de corante, e levados para clareamento. O tecido vegetal, embebido em glicerina, foi aquecido por aproximadamente cinco minutos, e armazenados em glicerina, na geladeira. Após o processo de coloração, todos os fragmentos das raízes foram colocados em lâminas e fotografados sob microscópio óptico (aumento de 50x e 100x).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As duas técnicas de coloração testadas foram eficientes na visualização dos nematóides

dentro do sistema radicular da cultivar de soja Emgopa 313. Na primeira avaliação, realizada aos 10 dias após o plantio, foi possível a nítida visualização dos nematóides que infectavam os fragmentos radiculares corados, em ambas as técnicas utilizadas, para *H. glycines* e *M. incognita* (Figura 1-A e 1-B). Nos fragmentos radiculares

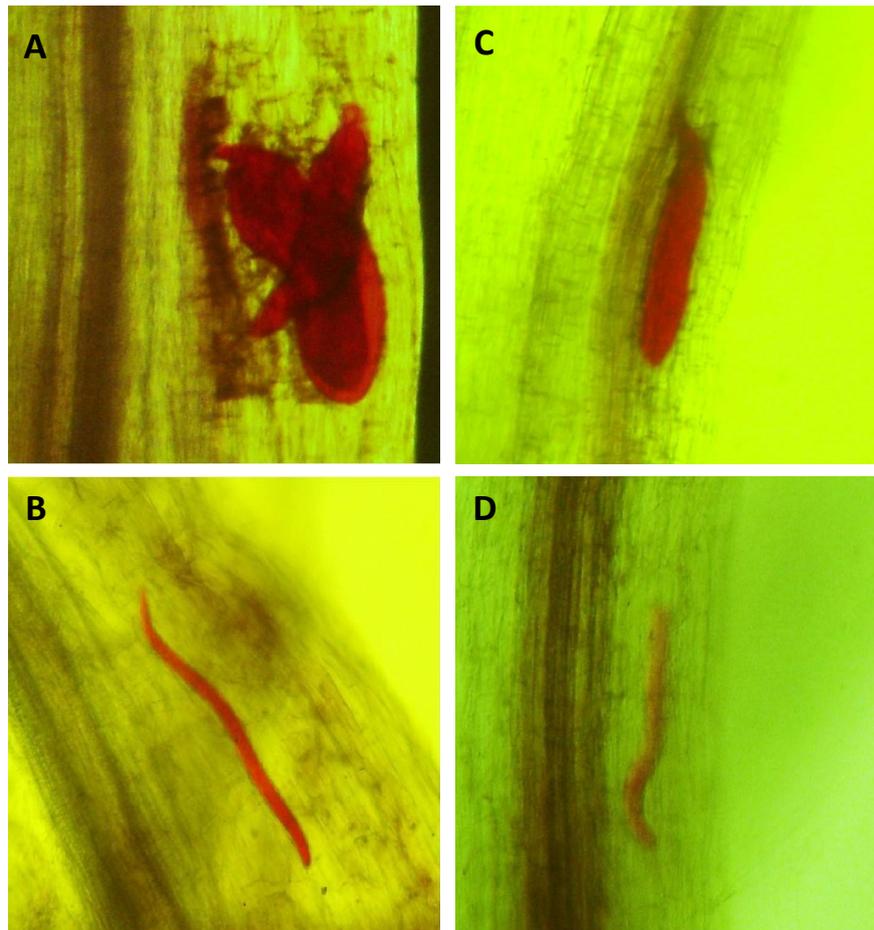
corados segundo a técnica de Tihohod (1993) pode-se visualizar a presença de juvenis de *H. glycines* (Figura 1-A), de *M. incognita* (Figura 1-B) e de *P. brachyurus* (Figura 1-C). Já na técnica de Byrd et al. (1983) pode-se visualizar juvenis de *H. glycines* (Figura 1-D) e de *M. incognita* (Figura 1-E).



**Figura 1.** Fragmentos radiculares de soja (*Glycine max*), infectados por *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*, aos 10 dias após do plantio. A-C: Coloração com lacto-glicerol e fuccina ácida (Tihohod, 1993). A. Juvenis de *H. glycines*. B. Juvenil de *M. incognita*. C Juvenil de *P. brachyurus*. D-E: Coloração com técnica de clareamento e fuccina ácida (Byrd et al., 1983). D. Juvenil de *H. glycines*. E. Juvenil salsichóide de *M. incognita*.

Com relação ao nematóide *P. brachyurus*, este só foi encontrado em fragmentos radiculares corados segundo a técnica de Tihohod (1993) (Figura 1-C). A ausência desse nematóide nos fragmentos corados com a técnica de Byrd et al. (1983) pode ter ocorrido em função da duração do ciclo do *Pratylenchus* que varia de 54 a 65 dias, sendo que o estágio J2 ocorre cerca de 11 dias após a inoculação (Castillo e Vovlas 2007). Dessa forma, é normal não encontrar esses nematóides infectando o sistema radicular aos 10 e mesmo aos 17 dias após o plantio.

Na segunda avaliação, realizada aos 17 dias após o plantio, foi possível a visualização de fêmeas e juvenis de *H. glycines* (Figura 2-A e 2-C) e de juvenis de *M. incognita* (Figura 2-B e 2-D) em ambas as técnicas empregadas. A identificação das fêmeas de *H. glycines* e mesmo de *M. incognita* é possível graças ao formato do corpo desses nematóides quando adultos. Novamente não foi possível a observação de indivíduos de *P. brachyurus* em função da duração do seu ciclo de vida.



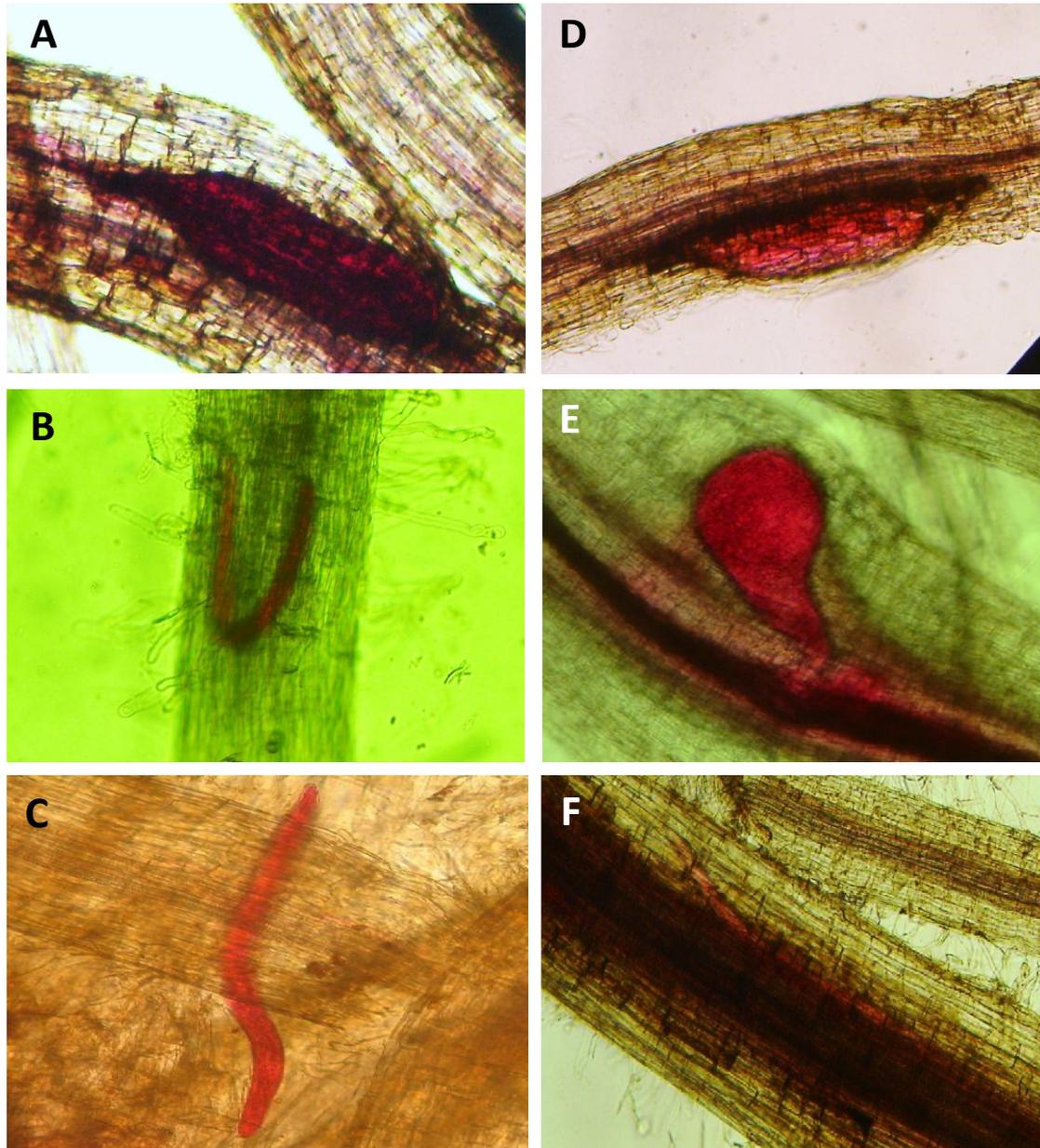
**Figura 2.** Fragmentos radiculares de soja (*Glycine max*), infectados por *Heterodera glycines* e *Meloidogyne incognita*, aos 17 dias após do plantio. A-B: Coloração com lacto-glicerol e fuccina ácida (Tihohod, 1993). A. Fêmeas de *H. glycines*. B. Juvenil de *M. incognita*. C-D: Coloração com técnica de clareamento e fuccina ácida (Byrd *et al.*, 1983). C. Fêmea de *H. glycines*. D. Juvenil de *M. incognita*.

Na terceira avaliação, realizada aos 25 dias após o plantio, foi possível a observação de fêmeas de *H. glycines* (Figura 3-A e 3-D) e de juvenis e fêmeas de *M. incognita* (Figura 3-B e 3-E) em ambas as técnicas testadas. Nesta avaliação pode-se observar também a presença de juvenis de *P. brachyurus* (Figura 3-C e 3-F). No entanto, a densidade de infecção do tecido radicular por *P. brachyurus* foi bem menor quando comparada com os demais nematóides avaliados. A presença de *P. brachyurus* nesta avaliação confirma a eficiência das duas técnicas testadas na visualização desse nematóide no tecido radicular.

Durante as avaliações realizadas foi possível observar o fechamento do ciclo dos nematóides *H. glycines* e *M. incognita*. Segundo Young (1992) o ciclo de vida do *H. glycines*, com uma temperatura variando entre 23° e 25°C, dura cerca de 21 a 24 dias e segundo Taylor e Sasser (1978) para *M. incognita*, em temperatura de 26°C, o ciclo completa-se em 21 dias, o que ficou evidenciado nas avaliações realizadas 25 dias após o plantio com presença de fêmeas desses nematóides nos sistemas radiculares avaliados. Com relação ao ciclo

do *P. brachyurus* não foi possível verificar o fechamento devido ao período necessário que o nematóide leva para completá-lo, que é bem superior aos outros dois nematóides avaliados.

As duas técnicas utilizadas permitiram a observação dos três nematóides avaliados dentro do tecido radicular de soja e evidenciou o maior comprimento do ciclo de *P. brachyurus* conforme relatado por Castillo e Volvas (2007). Para tecidos menos tenros ambas as técnicas são bastante eficientes, no entanto, em tecidos com maior idade fisiológica a técnica de Byrd *et al.* (1983) seria recomendada por realizar um clareamento com NaOCl e facilitar a coloração e visualização dos nematóides. Os tecidos mais tenros, corados utilizando a técnica de Tihohod (1993), além de acumularem mais corante, em função da concentração inicial de fucsina ácida utilizada, ficam mais escuros podendo inviabilizar a observação dos nematóides. Portanto, a eficiência das técnicas de coloração foi comprovada, devendo a idade fisiológica do tecido radicular ser um fator a ser observado no momento da escolha da técnica.



**Figura 3.** Fragmentos radiculares de soja (*Glycine max*), infectados por *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*, aos 25 dias após do plantio. A-C: Coloração com lacto-glicerol e fuccina ácida (Tihohod, 1993). A. Fêmea de *H. glycines*. B. Juvenil de *M. incognita*. C. Juvenil de *P. brachyurus*. D-F: Coloração com técnica de clareamento e fuccina ácida (Byrd *et al.*, 1983). D. Fêmea de *H. glycines*. E. Fêmea de *M. incognita*. F. Juvenil de *P. brachyurus*.

#### REFERÊNCIAS

Asmus GL, Tomazzini MD, Ferraz LCCB. Penetração de *Heterodera glycines* em raízes de soja resistente. *Nematologia Brasileira*, 25 (2): 251-253, 2001.

Byrd DW, Kirpatrick T, Barker KR. An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15 (1): 142-143, 1983

Castillo P, Vovlas N. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management. In: Castillo P, Vovlas N. *Biology and ecology of Pratylenchus*. Brill, Leiden-Boston, 2007, p. 305-324.

Diogo AM, Sediyaama T, Lima RD, Sediyaama, CS. Penetração e Reprodução de *Heterodera glycines*, raça 3,

em algumas espécies vegetais. *Nematologia Brasileira*, 24 (1): 27-32, 2000.

Fenner LM. Determination of nematode mortality. *Plant Disease Reporter* 46: 383, 1962.

Holbrook CC, Knauff DA, Dickson, DW. A technique for screening peanut for resistance to *Meloidogyne arenaria*. *Plant Disease* (57):957-958, 1983.

Mcbeth CW, Taylor AL, Smith AL. Note on staining nematodes in root tissues. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, (16):3-6, 1941.

Southey JF. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. *Technical Bulletin of the Ministry of*

Agriculture, Fisheries & Food No. 2. 5th ed. London: Her Majesty's Stationery Office, 1970.

Taylor AL, Sasser, JN. Biology, identification and control of root-knot nematodes. In: Taylor AL, Sasser JN. The genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). North Carolina State University Graphics. Raleigh, 1980, p. 1-11.

Thies JA, Merrill SB, Corley EL. Red food coloring stain: new, safer procedures for staining nematodes in roots and egg masses on root surfaces. *Journal of Nematology*, 34 (2): 179-181, 2002.

Tihohod D. Nematologia agrícola aplicada. In: Tihoho D. Métodos de coloração de nematóides em tecidos de plantas. FUNEP, Jaboticabal, 1993, p. 54-55.

Young LD. Biology and management of the soybean cyst nematode. In: Riggs RD, Wrather JA. Epiphytology and life cycle. APS Press, St. Paul, 1992, p. 27-36.