



**ASPECTOS DO PARASITISMO E DA  
PRIVAÇÃO ALIMENTAR DO NEMATÓIDE  
DE GALHAS (*Meloidogyne javanica*) E DO  
CISTO (*Heterodera glycines*) EM SOJA**

**HERCULES DINIZ CAMPOS**

**2003**

56981

UFV 009131

HERCULES DINIZ CAMPOS

ASPECTOS DO PARASITISMO E DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR DO  
NEMATÓIDE DE GALHAS (*Meloidogyne javanica*) E DO CISTO  
(*Heterodera glycines*) EM SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Doutorado em Agronomia, área de concentração  
em Fitopatologia, para obtenção do título de  
"Doutor".

Orientador

Prof. Dr. VICENTE PAULO CAMPOS

BIBLIOTECA GERAL  
UFV  
10.53.349  
CHC  
18.03.03

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Campos, Hercules Diniz

Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja / Hercules Diniz Campos. -- Lavras : UFLA, 2003.

203 p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Soja. 2. Parasitismo. 3. Nematóide de galha. 4. Nematóide de cisto.  
5. Reserva energética. 6. Temperatura. 7. Substrato. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-632.2  
-633.3492

**HERCULES DINIZ CAMPOS**

**ASPECTOS DO PARASITISMO E DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR DO  
NEMATÓIDE DE GALHAS (*Meloidogyne javanica*) E DO CISTO  
(*Heterodera glycines*) EM SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 02 de outubro de 2003

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

UFLA

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA

Dr. João Flávio Veloso Silva

Embrapa Soja

Prof. Dr. Rovilson José de Souza

UFLA



Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

UFLA

(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

**Aos meus pais, Neyde e Joaquim,  
A todos os meus familiares.**

**Ofereço**

**À minha esposa, Heloisa,  
À minha filha, Júlia.**

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida e pela realização deste trabalho.

À Fundação do Ensino Superior de Rio Verde – FESURV, pelo apoio e liberação para realização do curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, através do Programa de Integração e Capacitação de Docentes e Técnicos – PICDT, pela concessão de bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos, estímulo, amizade e exemplo de profissionalismo, jamais será esquecido.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Dr. Edson Ampélio Pozza pelas sugestões nas análises estatísticas.

Ao pesquisador Dr. João Flávio Veloso Silva e aos professores Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende e Dr. Rovilson José de Souza pelas sugestões.

Ao funcionário Tarley pelo valioso auxílio na avaliação dos trabalhos e aos funcionários Cleber e Tales pelos auxílios laboratoriais, convivência e amizade.

Aos colegas de trabalho, João, Fernando, Marcos Roberto, José Mauro, Cacilda, Sônia e Waldir, pelas sugestões, convivência e amizade.

Aos alunos da iniciação científica e estagiários do Laboratório de Nematologia pela amizade e convivência.

Aos demais colegas e funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela convivência e amizade.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	v
<b>CAPÍTULO 1 Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (<i>Meloidogyne javanica</i>) e do cisto (<i>Heterodera glycines</i>) em soja.....</b>	<b>1</b>
1 Introdução Gcral .....	2
2 Referêncial Teórico .....	4
2.1 Influência da textura do substrato ou do solo na movimentação de juvenis do segundo estágio (J2) e na população de <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Heterodera glycines</i> .....	4
2.2 Influência da temperatura na penetração de <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Heterodera glycines</i> .....	5
2.3 Influência da temperatura no desenvolvimento e reprodução de <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Heterodera glycines</i> .....	8
2.4 Influência da temperatura no desenvolvimento embrionario em ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	10
2.5 Influência da temperatura na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne</i> spp.....	12
2.6 Influência da reserva corporal do juvenil do segundo estágio (J2) na penetração, desenvolvimento e reprodução de <i>Meloidogyne</i> spp.....	13
2.7 Graus-dia no desenvolvimento de <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Heterodera glycines</i> .....	15
2.8 Influência da temperatura na resistência de plantas a <i>Meloidogyne</i> spp. e a <i>Heterodera glycines</i> . ....	17
3 Referências Bibliográficas .....	19

<b>CAPÍTULO 2: Efeito do tempo, substrato e temperatura na penetração de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i>.....</b>	<b>28</b>
1 Resumo .....	29
2 Abstract .....	30
3 Introdução .....	31
4 Material e Métodos .....	33
4.1 Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> .....	33
4.2 Efeito do tempo e de substrato na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> em raízes de soja .....	34
4.3 Efeito de temperatura na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> em raízes de soja.....	35
5 Resultados e Discussão .....	37
5.1 Efeito do tempo e de substrato na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>Heterodera glycines</i> em raízes de soja.....	37
5.2 Influência da temperatura na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>Heterodera glycines</i> em raízes de soja. ....	41
6 Conclusões .....	45
7 Referências Bibliográficas .....	46
<b>CAPÍTULO 3: Penetração e migração de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i>.....</b>	<b>49</b>
1 Resumo .....	50
2 Abstract .....	51
3 Introdução .....	52



4 Material e Métodos .....	53
4.1 Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> .....	53
4.2 Capacidade migratória de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> em raízes de soja após diferentes períodos da inoculação.....	53
4.3 Efeito do tempo de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> na capacidade de penetração e na migração em raízes de soja. ....	54
5 Resultados e Discussão .....	56
5.1 Capacidade migratória de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> em raízes de soja após diferentes períodos da inoculação. ....	56
5.2. Influência do tempo de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> na capacidade de penetração e na migração em raízes de soja. ....	61
6 Conclusões.....	68
7 Referências Bibliográficas.....	69
<b>CAPÍTULO 4: Estudos de inóculo, inoculação e de extração do nematóide de galhas (<i>Meloidogyne javanica</i>).....</b>	<b>72</b>
1 Resumo .....	73
2 Abstract.....	74
3 Introdução.....	75
4 Material e Métodos.....	77
4.1 Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	77
4.2 Estudos sobre local de inoculação de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em plantas de tomateiro.....	77

4.3 Avaliação de métodos de extração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em diferentes substratos.....	79
4.4 Reprodução e quantificação dos ovos em processos de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário e formação do juvenil de <i>Meloidogyne javanica</i> em diferentes períodos de tempo após a inoculação de tomateiro.....	81
5 Resultados e Discussão.....	83
5.1 Efeito dos locais de inoculação de juvenis do segundo estágio (J2) na reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em plantas de tomateiro.....	83
5.2 Avaliação de métodos de extração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em diferentes substratos.....	85
5.3 Reprodução e quantificação dos ovos em processo de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário e formação do juvenil de <i>Meloidogyne javanica</i> em diferentes períodos de tempo após a inoculação de tomateiro.....	88
6 Conclusões .....	91
7 Referências Bibliográficas .....	92
<b>CAPÍTULO 5: Local e quantificação da penetração de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> em raízes intactas e seccionadas de soja.....</b>	<b>95</b>
1 Resumo .....	96
2 Abstract .....	97
3 Introdução .....	98
4 Material e Métodos .....	100
4.1 Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> .....	100
4.2 Efeito do tempo na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em segmentos de raiz de soja .....	100

4.3 Efeito do posicionamento de segmentos de raiz de soja na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> ou de <i>Heterodera glycines</i> .....	101
4.4 Efeito da obstrução das extremidades do segmento de raiz na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> ou <i>Heterodera glycines</i> .....	102
4.5 Penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> em plantas intactas e seccionadas.....	103
5 Resultados e Discussão.....	105
5.1 Efeito do tempo na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em segmentos de raiz de soja .....	105
5.2 Efeito do posicionamento de segmentos de raiz de soja na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> ou <i>Heterodera glycines</i> .....	108
5.3 Efeito da obstrução das extremidades do segmento de raiz na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> ou <i>Heterodera glycines</i> .....	110
5.4 Penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> em plantas intactas e seccionadas.....	113
6 Conclusões .....	115
7 Referências Bibliográficas .....	116
<b>CAPÍTULO 6: Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio na penetração e na reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em soja.....</b>	<b>119</b>
1 Resumo .....	120
2 Abstract .....	121
3 Introdução .....	122
4 Material e Métodos .....	124

4.1 Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	124
4.2 Influência do tempo de incubação no percentual de lipídios neutros de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	124
4.3 Influência do tempo de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> na capacidade de penetração, desenvolvimento e reprodução em raiz de soja.....	125
4.4 Penetração, desenvolvimento e reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em raiz de soja, após a incubação dos juvenis do segundo estágio (J2) em temperaturas fixas e variadas em tempos diferentes.....	127
5 Resultados e Discussão .....	129
5.1 Influência do tempo de incubação no percentual de lipídios de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	129
5.2 Influência do tempo de incubação em água de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> na capacidade de penetração, desenvolvimento e reprodução em raiz de soja.....	133
5.3 Influência de temperatura na penetração, desenvolvimento e reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em raiz de soja, após a incubação dos juvenis do segundo estágio (J2) em temperaturas fixas e variadas em tempos diferentes.....	135
6 Conclusões .....	143
7 Referências Bibliográficas .....	144
<b>CAPÍTULO 7: Efeito da temperatura do solo no desenvolvimento e reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>Heterodera glycines</i> em cultivares resistentes e suscetíveis de soja.....</b>	<b>146</b>
1 Resumo .....	147
2 Abstract .....	148
3 Introdução .....	149
4 Material e Métodos .....	151

4.1 Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> .....	151
4.2 Penetração e desenvolvimento de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> ou de <i>Heterodera glycines</i> raça 3 em raiz de soja suscetível e resistente crescidas em diferentes temperaturas no solo.....	151
4.3 Reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> raça 3 em raiz de soja suscetível e resistente crescidas em diferentes temperaturas no solo.....	153
4.4 Acúmulo de graus-dia para o desenvolvimento de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> .....	154
5 Resultados e Discussão .....	155
5.1 Efeito da temperatura do solo no desenvolvimento e reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em raiz de soja suscetível e resistente.....	155
5.2 Efeito da temperatura do solo no desenvolvimento e reprodução de <i>Heterodera glycines</i> raça 3 em raiz de soja suscetível e resistente.....	160
5.3 Acúmulo de graus-dia para o desenvolvimento de <i>Meloidogyne javanica</i> e de <i>Heterodera glycines</i> .....	163
6 Conclusões .....	164
7 Referências Bibliográficas .....	165
<b>CAPÍTULO 8: Flutuações térmicas na eclosão e no desenvolvimento embrionário de <i>Meloidogyne javanica</i></b> .....	167
1 Resumo .....	168
2 Abstract.....	169
3 Introdução .....	170
4 Material e Métodos .....	172
4.1 Obtenção de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> no estágio embrionário de duas células ou contendo juvenis.....	172

4.2 Efeito de temperaturas fixas e variadas na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	172
4.3 Efeito de temperatura fixas e variadas no desenvolvimento embrionário de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	173
5 Resultados e Discussão .....	175
5.1 Efeito de temperaturas fixas e variadas na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	175
5.2 Efeito de temperaturas fixas e variadas no desenvolvimento embrionário de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	177
6 Conclusões .....	185
7 Referências Bibliográficas .....	186
<b>CAPÍTULO 9: Penetração e reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em raiz seccionada de soja e evasão de juvenis do segundo estágio (J2).....</b>	<b>188</b>
1 Resumo .....	189
2 Abstract.....	190
3 Introdução .....	191
4 Material e Métodos .....	193
4.1 Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	193
4.2 Efeito do seccionamento radicular da soja na penetração, desenvolvimento e reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	193
4.3 Penetração e evasão de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em raiz de soja.....	195
5 Resultados e Discussão .....	196
6 Conclusões.....	201
7 Referências Bibliográficas.....	202

## RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. 2003. 203 p. Tese-(Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

A maior penetração de J2 de *Meloidogyne javanica* ocorreu aproximadamente aos 4,4 dias após a inoculação. Na mistura de solo + areia grossa, houve aumento do número de J2 a partir dos 2 dias até 8 dias após a inoculação. Para *Heterodera glycines*, na areia fina, o número de J2 observado no interior das raízes foi alto aos 2 dias da inoculação. Na mistura de solo + areia grossa, houve aumento do número de J2 de *H. glycines* na raiz a partir dos 2 dias após a inoculação. Na temperatura de 24° C ocorreu maior ( $P \leq 0,05$ ) penetração de J2 de *M. javanica* indiferente da resistência da cultivar. Entretanto, na cultivar resistente, a penetração não foi alterada ( $P \leq 0,05$ ) na temperatura de 28° C. A 32° C ocorreu queda significativa, chegando a 17,97% daquela em 28° C e semelhante àquelas a 16 e 20° C. A 12° C não ocorreu penetração em qualquer cultivar testada. Para *H. glycines* a temperatura de 21,3° C proporcionou maior penetração de J2 na cultivar suscetível, e a 22,4° C maior penetração na resistente. A redução na penetração a 12 e 32° C foi semelhante e também indiferente da reação hospedeiro, porém correspondendo aproximadamente a metade daquelas temperaturas com máxima penetração. Em temperatura de 12° C os J2 de *H. glycines* penetraram nas raízes das cultivares testadas em proporções semelhantes aquelas observadas na de 32° C. O modo de penetração de *M. javanica* foi estudado em raízes de soja. Observou-se acúmulo dos J2 de *M. javanica* na coifa e região de crescimento, com predomínio de tecido meristemático, onde penetraram, seguido de migração entre os feixes pelas células parenquimatosas dos tecidos vasculares. Quantitativamente, nas primeiras 24 horas após a penetração, os J2 foram encontrados apenas na região de crescimento, decrescendo até 96 horas após, quando foram observados aquém desta região. A distância percorrida pelo J2 de *M. javanica* em 96 horas após a inoculação foi de 14,20 mm em relação à coifa e significativamente diferentes daquela observada às 24 horas. Diferentemente de *M. javanica*, os J2 de *H. glycines* penetraram apenas pela região de alongamento e lateralmente na raiz, movimentando-se para o cilindro central sem nenhum direcionamento para o meristema. Não foram observados J2 de *H. glycines* na região de crescimento da

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

raiz. Maior penetração ocorreu com 24 horas. A incubação dos J2 em água por 4 dias ou mais diminuiu a penetração de *M. javanica* e de *H. glycines*, porém esse efeito foi mais drástico em *H. glycines*. Estudos foram realizados sobre formas de inoculação de nematóides e extração. Ao avaliar a forma de inoculação no hospedeiro e métodos de extração de J2 do substrato, a maior reprodução de *M. javanica* em tomateiro ocorreu quando a inoculação foi realizada na rizosfera da planta. Mas a inoculação fora da rizosfera, delimitada pela moldura de gesso, pode facilitar estudos de exaustão da reserva corporal do J2. Os métodos por centrifugação em sacarose (MCS), de Jenkins (1964) modificado (MJM) e o de decantação em água (MDA) foram mais eficientes na recuperação de J2 de *M. javanica*. A fêmea de *M. javanica* desenvolvida em tomateiro a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$  iniciou a postura 20 dias após a inoculação do J2, com ovos apenas na fase de multiplicação celular. A maior população de ovos ocorreu aos 26 e 28 dias após a inoculação dos J2. Aos 22 dias após a inoculação predominou o estágio pluricelular dentro dos ovos. Aos 24 e 26 dias já ocorreu aumento significativo nos estádios de desenvolvimento embrionário e de juvenil formado. Quanto ao local de penetração de J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines* em segmentos de raiz de soja, observou-se que os J2 de *M. javanica* penetram tanto na coifa como na região de crescimento próximo ao meristema e no local seccionado do segmento da raiz de soja. Já a penetração dos J2 de *H. glycines* predominou na região de alongamento da raiz. Em qualquer período de tempo o número de J2 de *M. javanica* penetrados na região seccionada do segmento foi aproximadamente 3 vezes maior quando comparado ao da coifa. A penetração de J2 de *H. glycines* em segmento de raiz foi mais baixa do que *M. javanica*. A obstrução das duas extremidades do segmento com parafina resultou em 82,9% de redução na penetração tanto de *H. glycines* como de *M. javanica*. Maior ( $P \leq 0,05$ ) número de J2 de *M. javanica* penetrou no segmento de raiz, comparado com a planta intacta. Para *H. glycines*, maior ( $P \leq 0,05$ ) penetração de J2 ocorreu nas plantas intactas e nas seccionadas no colo, comparadas com as sem folhas e com o segmento de raiz. Estudos foram realizados relacionando o teor de lipídios do J2 de *M. javanica* com o tempo de armazenamento. O teor de lipídio no J2 diminuiu significativamente em cada período de incubação em água, no intervalo de 2 a 12 dias, chegando a 56,12% de queda aos 4 dias de incubação. Quando os J2 foram incubados por 2 dias, e em seguida inoculados em soja, ocorreram quedas significativas na penetração, número de fêmeas e na reprodução. O número de ovos chegou a ser reduzido em 44,64% em relação a inoculação dos J2 recentemente eclodidos. Nesse período de incubação, ocorreu redução de 38,82% no teor de lipídio do J2. Entretanto, a patogenicidade dos J2 foi mantida até 12 dias de incubação, porém com reduções de 67,36%, 82,75% e 86,09% no número de J2 penetrados, fêmeas e massa de ovos, respectivamente. Noutro ensaio, os J2 foram incubados em água com temperaturas fixas de  $5^\circ \text{C}$ ,  $10^\circ \text{C}$  e  $28^\circ \text{C}$  e em temperaturas variadas de 10 horas a  $5^\circ \text{C}$  ou  $10^\circ \text{C}$



complementadas com 14 horas a 28° C, e analisada sua patogenicidade pela inoculação em soja a cada 5 dias de incubação durante 20 dias, avaliando-se o número de J2 penetrado, de fêmeas, massas de ovos e total de ovos. Em cada período avaliado, a incubação dos J2 em temperaturas fixas de 5° C, 10° C e 28° C afetou significativamente as variáveis avaliadas, sendo mais detrimental a 5° C, menos a 10° C e intermediária a 28° C. As temperaturas variadas comportaram-se como a fixa a 28° C, com tendência para melhoria da patogenicidade quando alterada com 10° C. A incubação por 20 dias levou à redução drástica da patogenicidade em qualquer temperatura de incubação. Ao se estudar o efeito de temperaturas fixas do solo no desenvolvimento e na reprodutividade de *M. javanica* e de *H. glycines* raça 3 em cultivar resistente e suscetível de soja, em temperatura do solo a 28° C, ocorreram melhores desenvolvimento e reprodução em qualquer cultivar e piores a 20° C. Na temperatura de 28° C a reprodução e o sucesso no parasitismo de *M. javanica* nas cultivares resistentes MGBR-46 e BRSMG Garantia foram semelhantes aos da suscetível Embrapa 20. De modo geral, o parasitismo de *H. glycines* foi favorecido no intervalo de temperatura de 24 a 28° C. Mas a temperatura não afetou a resistência da cultivar BRSMG Liderança a *H. glycines* raça 3. Para *M. javanica*, o requerimento térmico foi de 425,76 graus-dia para completar o seu desenvolvimento após a penetração do J2, para *H. glycines*, foi de 452,64 a 545,76 graus-dia, em soja. O efeito de flutuação de temperaturas em população de ovos de *M. javanica* com estágio de desenvolvimento padronizado mostrou que, quando utilizaram-se ovos com juvenis já formados, maior percentual de eclosão ocorreu em temperatura fixa de 28° C. A redução do tempo de exposição a esta temperatura reduziu a eclosão. A exposição dos ovos por 10 horas a 10° C, seguida de 14 horas a 28° C, proporcionou maior eclosão dos J2 do que a de 10 horas a 5° C, seguida de 14 horas a 28° C. Já a incubação em temperatura constante de 10° C proporcionou menor taxa de eclosão. Quando foram usados ovos no estágio de 2 células, a incubação a 28° C acelerou a multiplicação celular e o desenvolvimento embrionário. Aos 6 dias de incubação já havia mais de 80% de ovos com juvenis. A incubação em temperatura constante de 10° C permitiu apenas a multiplicação celular. Em temperaturas variadas, por 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C, a inoculação proporcionou maior e mais rápido desenvolvimento do nematóide do que em 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C. Maior exposição a 28° C acelerou todos os processos envolvidos na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na saída do J2 do ovo. Entretanto, a interrupção desse processo por temperatura de 5° C causou efeitos deletérios irreversíveis nas células, embriões ou juvenis dentro dos ovos. Quanto a capacidade de parasitismo de *M. javanica* em soja com raízes seccionadas e a taxa de evasão em raízes de soja suscetível, verificou-se que o corte das raízes afetou quantitativamente a penetração, o desenvolvimento e a reprodução de *M. javanica* em soja, comparada com a planta com o sistema radicular intacto.

Quanto maior foi a seção feita nas raízes, menor foi a penetração, o número de fêmeas e as massas de ovos. A seção feita a 30 mm da coifa proporcionou os menores números de J2, fêmeas, massas de ovos e de ovos, significativamente diferentes daqueles da seção a 5 mm da coifa. A reprodução de *M. javanica* avaliada em ovos por sistema radicular, como por grama de raiz foi a mais alta ( $P \leq 0,05$ ) na planta com raízes intactas e significativamente reduzida com o tamanho da seção feita na raiz. O número de J2 evadidos foi baixo, chegando a 4,17% aos 20 dias. O sucesso no desenvolvimento pós-embriônico de *M. javanica* variou de 90,28 a 97,22% aos 20 e 12 dias após a inoculação, respectivamente. A população de fêmeas foi proporcional ao número de J2 penetrados a partir de 4 dias da inoculação.

## ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. 203 p. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

By using fine sand, greater penetration of J2 of *Meloidogyne javanica* in soybean roots occurred at 4,4 days after inoculation. By using mixture of soil and ground sand, the numbers of J2 of *M. javanica* in soybean roots increase from the 2 days at 8 days after inoculation. To *Heterodera glycines*, when fine sand was used, the number of J2 observed in the roots was higher at 2 days after inoculation, followed by reduction in other time periods amounting. By using the mixture of soil and ground sand, there increase of number of J2 of *H. glycines* in the root starting from 2 days after inoculation. At 24° C temperature occurred greater ( $P \leq 0,05$ ) penetration of J2 of *M. javanica* unlikely to cultivar resistance. However, in the resistant cultivar the penetration was not altered ( $P \leq 0,05$ ) at 28° C temperature. At 32° C occurred significant decrease reaching to 17,97% of that at 28° C and similar to that at 16 and 20° C. In the susceptible cultivar the penetration decrease was significant at 28° C and followed the same at 32° C, amounting to 34,74% of that at 24° C, and even greater than that at 16 and 20° C. At 12° C penetration was not observed in any tested cultivar. To *H. glycines*, the temperatures of 21,3° C provided larger penetration of J2 in susceptible cultivar, and 22,4° C in resistant cultivar. The reduction on penetration of J2 at 12 and 32° C was similar and also unlike of host reaction, but corresponding approximately the half of that at the temperatures of 16 and 28° C. At temperature of 12° C the J2 of *H. glycines* penetrated in roots of tested cultivar at the same rate as at the 32° C. The mode of penetration of *M. javanica* on soybean roots. Crowding of J2 of *M. javanica* was observed at the root cap and growth region of the soybean root close to the meristem, where the J2 penetrated, followed by migration within the vessels through the parenchymatous cells. Quantitatively, at the first 24 hours after inoculation, the J2 were found, only, at the growth region of the root, decreasing since then, until 96 hours after, when they were observed away of this region. The distance travelled by the J2 of *M. javanica* in 96 hours after inoculation was 14,20 mm from that at 24 hours after. However, the penetration was greater ( $P \leq 0,05$ ) at 72 hours after inoculation. Unlike of *M. javanica*, the J2 of *H. glycines* penetrated only at

---

\* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Edson Ampélio Pozza- UFLA and Mário Lúcio Vilela Resende- UFLA.

elongation region of root and laterally, followed by movement toward central cylinder without any moving to the meristem. Any J2 of *H. glycines* was observed at the growth region of the root. Great penetration of *H. glycines* J2 occurred at 24 hours after inoculation. The incubation of J2 in water by 4 days or more, decreased the penetration of *M. javanica* and *H. glycines*, however, this effect was greater in *H. glycines*. Studies were done on the local to inoculate the rhizosphere with nematode and extraction. Greater reproduction of *M. javanica* in tomato occurred when inoculation was done in the plant rhizosphere. But the inoculation away of that delimited by form made of gypsum at the size of seedling cell of germinating box, may facilitate studies on exhaustion of body reserve of energy of J2. The methods of centrifugation on sucrose (MCS), modified Jenkins (1964) (MJM) and decantation in water (MDA) were better on recovering of J2 of *M. javanica*. The female of *M. javanica* developed in tomato at  $27 \pm 2^\circ$  C initiated the egg laying 20 days after J2 inoculation, with eggs only on cellular multiplication phase. Great egg production occurred 26 to 28 days after inoculation of the J2. At the 24 to 26 days periods occurred greater ( $P \leq 0,05$ ) increase in embryonic development stage and formed juveniles in the eggs. At 28 days occurred, predominately, the gastrula stage and formed juveniles in the eggs, with only 38,39% of the eggs at the cellular multiplication phases, which can be characterized as a good inoculum for research. Studies were done on penetration of J2 into cut and excised roots of soybean. J2 of *M. javanica* penetrated into root cap and growth region close to the meristem, as well as the cutted side of the root piece of soybean. J2 of *H. glycines* penetrated predominately into the elongation region of the root. In any period of time, the numbers of J2 of *M. javanica* penetrated into the cutted region of the 2 cm root piece was, approximately, 3 times as much as in the root cap. Greater penetration of J2 of *M. javanica* occurred when only one piece of root of two cm long was planted instead of two or three into the same place. However, the penetration of J2 of *H. glycines* in two cm long root piece was lower than *M. javanica*. The plugging of both tips of the root piece with paraffin resulted in 82,9% reduction on penetration either of *H. glycines* or *M. javanica*. However, the plugging of only one tip of the root piece increased the penetration of J2 of *M. javanica* into the other. Greater ( $P \leq 0,05$ ) number of J2 of *M. javanica* penetrated into the 2 cm root piece compared to non-excised root plant. Greater ( $P \leq 0,05$ ) penetration of J2 of *H. glycines* occurred in non-excised root plant and also in plants with cutted shoots compared to the root of plants without leaves and to the 2-cm root piece. The relationship of lipid content of J2 and time of incubation on water was investigated. The lipid content of J2 body decreased significantly in each period of incubation from 2 to 12 days, reaching 56,12% decrease on four days of incubation. When J2 were incubated in water for 2 days, followed by inoculation in soybean, significant decrease occurred in penetration, number of females and reproduction. The number of eggs was

reduced by 44,64% compared to inoculation of recently hatched J2. In this period of incubation occurred 38,82% reduction on lipid content of J2 body. However, the pathogenicity of J2 was kept until 12 days of incubation with reduction of 67,36%, 82,75% and 86,09% on the number of penetrated J2, females and eggs mass, respectively. In another assay, the J2 were incubated in water at fixed temperatures of 5° C, 10° C and 28° C, and at varied temperatures of 10 hours at 5° C or 10° C and complemented with 14 hours at 28° C, and checked their pathogenicity by inoculating in soybean, the J2 incubated by every 5 days during 20 days period and evaluating the numbers of penetrated J2, females, egg mass and total egg. In each evaluated period, the incubation of J2 at fixed temperatures of 5° C, 10° C and 28° C affected, significantly the evaluated variables. The least, good and intermediate pathogenicity occurred when J2 were incubated at fixed temperature of 5° C, 10° C and 28° C. The effect of varied temperatures was similar to fixed 28° C with tendency of better pathogenicity when alternated with 10° C. The incubation by 20 days led to a drastic reduction on pathogenicity in any tested incubation temperature. The effect of fixed temperatures of the soil on post-embryonic development and on reproduction of *M. javanica* and *H. glycines* race 3, as well as the temperature requirement to complete its development in resistant and susceptible soybean cultivars was studied. When the soil temperature was kept at 28° C occurred better post-embryonic development and greater reproduction in any cultivar, and the worst at 20° C. At 28° C the reproduction and the parasitism success of *M. javanica* in resistant cultivars MGBR-46 and BRSMG Garantia were similar to the susceptible Embrapa 20. In general, the parasitism of *H. glycines* was good from 24 to 28° C. To *M. javanica* the temperature requirement was of 425,76 degrees-day to complete its development after penetration of J2 and to *H. glycines* it was 452,64 to 545,76 degree-day, in soybean. Studies were done on the effect of temperatures fluctuation in eggs population of *M. javanica* with standardized development. When eggs with formed juveniles inside were used, greater percentage on hatching occurred at fixed temperature of 28° C. The reduction of the exposure time at 28° C reduced hatching. The eggs exposure for 10 hours at 10° C complemented by 14 hours at 28° C gave greater J2 hatching compared to 10 hours at 5° C complemented by 14 hours at 28° C. The incubation at fixed temperature of 10° C gave low hatching. When eggs at the two-cell stage were used and incubated at 28° C the cell multiplication and embryonic development were speeded. At four days of incubation at 28° C occurred more than 50% of the eggs with juveniles. The incubation at fixed temperature of 10° C allowed the cellular multiplication only. At alternated temperatures of 10 hours at 10° C and complemented by 14 hours to 28° C gave greater and faster nematode development than 10 hours at 5° C complemented by 14 hours at 28° C. Greater exposure at 28° C speeded of all the processes involved on cell multiplication, embryonic development and J2 hatching. However, the interruption of these

process by temperature of 5° C caused irreversible deleterious effect on cells, embryos and juvenile inside of eggs. Studies were done on penetration, development and reproduction of *M. javanica* in cut root of susceptible soybean. The extension of the root cutting affected quantitatively the penetration of J2, development and reproduction of *M. javanica* in soybean compared to plant with intact root system. Greater extension of root cutting, lesser were the penetration of J2, number of female in the root and egg-mass. The cutting of 30 mm from the root cap resulted in lesser ( $P \leq 0,05$ ) number of J2, female, eggs-mass and eggs compared to 5 mm section. The number of eggs by root system and for gram of root were higher ( $P \leq 0,05$ ) in intact roots than in cut root system, and proportionally lesser according to the extension of the root cutting. The numbers of evaded J2 was low, reaching 4,17% of the total inoculated J2 at 20 days after inoculation. The success on pos-embryonic development of *M. javanica* varied from 90,28 to 97,22% at 20 and 12 days after inoculation, respectively. The female population of J2 penetrated into the root after 4 days from the inoculation.

## **CAPÍTULO 1**

**Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas  
(*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja.**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os nematóides de galhas (*Meloidogyne* spp.) e do cisto (*Heterodera glycines*) estão amplamente distribuídos nas principais regiões produtoras de soja no mundo, causando prejuízos aos produtores (Wrather *et al.*, 1997). No Brasil, no ano de 2000, as perdas na produção causadas por *Meloidogyne* spp. foram de 237.000 toneladas, e por *Heterodera glycines*, chegaram a 604.000 toneladas, somando mais de 185 milhões de dólares (Silva *et al.*, 2002). Atualmente, devido às perdas que causam, aliadas à habilidade em sobreviver às diversidades ambientais no campo, as espécies de nematóide de galhas *M. javanica* e o nematóide de cisto *Heterodera glycines* tornaram-se os patógenos de maior importância na cultura da soja (Embrapa, 2002).

O tempo de sobrevivência de fitonematóides em condições ambientais diversas varia entre as espécies e entre os diferentes estádios de desenvolvimento da mesma espécie (Evans, 1987). No entanto, ocorre no solo a permanência de ovos, juvenis e adultos de *Meloidogyne* spp. ou de cistos, os quais, na ausência completa da planta hospedeira, poderão exercer processos fisiológicos, favorecendo a sua sobrevivência (Cooper & Van Gundy, 1971; Schmitt, 1992). Os gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera*, endoparasitas sedentários, desenvolvem-se embrionariamente dentro do ovo até juvenil do segundo estágio (J2), o qual sai do ovo e penetra na planta, parasitando-a, iniciando, assim, o desenvolvimento pós-embriônico dentro do hospedeiro parasitado (Campos *et al.*, 2001; Agrios, 1997). Têm-se, nesse ciclo, efeitos dos fatores abióticos no nematóide, na planta e na interação de ambos, podendo alterar os períodos de tempo para cada estágio de desenvolvimento dentro do ovo, para eclosão de J2, penetração, desenvolvimento e reprodução (Fonseca & Jahn, 1998; Dropkin, 1976; Van Gundy, 1985). Entre esses fatores, a



temperatura é o mais importante, podendo afetar o ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. e de *Heterodera glycines* (Perry, 1987; Decker, 1989; Schmitt, 1992; Agrios, 1997; Qiu & Bedding, 2000; Campos *et al.*, 2001; Dutra, 2002). É necessário, entretanto, definir como e onde esse fator afeta o ciclo. No J2, reservas alimentícias são mantidas para, assim, possibilitar o desenvolvimento embrionário, o movimento após a saída do ovo e o parasitismo no hospedeiro (Van Gundy *et al.*, 1967; Christophers *et al.*, 1997). A atividade muscular excessiva eleva o gasto de energia do J2, impossibilitando o seu parasitismo no hospedeiro (Lee & Atkinson, 1977; Wright & Perry, 1998). Ainda são incompletas as informações sobre o efeito de temperaturas fixas ou em oscilação e as perdas das reservas nutricionais do J2 das espécies de *Meloidogyne* e de *H. glycines*, influenciando a penetração, o desenvolvimento e a reprodução desses patógenos na planta.

A temperatura afeta o nematóide e a planta. Em temperaturas altas do solo geralmente os nematóides apresentam alta atividade. O tomateiro, o pimentão e o feijão, contudo, reduzem suas resistências a *Meloidogyne* em temperaturas do solo acima de 28°C (Araújo *et al.*, 1982; Ammati *et al.*, 1986; Omwega *et al.*, 1990; Alves, 2000). Como as temperaturas altas do solo são mais freqüentes em países tropicais, os estudos desse efeito sobre resistência de plantas a nematóides, têm sido escassos e concentrados principalmente em algumas cultivares de tomateiro. Entretanto, a resistência de cultivares comerciais de soja a *M. javanica* e a *H. glycines* ainda não foi estudada em situações de temperaturas altas do solo. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar o efeito da temperatura nas diversas fases do desenvolvimento embrionário, no parasitismo e na reprodução de *M. javanica* e de *H. glycines* em soja.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1 Influência da textura do substrato ou do solo na movimentação de juvenis do segundo estágio (J2) e na população de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines*.

O substrato ou solo em que vivem os nematóides sofre a influência da umidade, do potencial osmótico, da textura, aeração, entre outras, os quais afetam a atividade e a sobrevivência de J2 de *Meloidogyne* (Van Gundy, 1985) e de *H. glycines* (Young, 1992). A textura do solo varia muito nos campos de cultivo. Prot & Van Gundy (1981) verificaram que o percentual de J2 de *M. incognita* hábeis em percorrer 20cm até a raiz de tomateiro aumentou de zero para 31,5% quando reduziram as frações de argila e de silte do solo, passando de 32,7 para 14%, demonstrando que a maior capacidade de migração de J2 de *M. incognita* está associada a solos arenosos. Em algodoceros cultivados em solos arenosos, as populações de *M. incognita* raças 3 e 4 foram maiores do que em solos argilosos, causando maior dano à cultura (Koenning *et al.*, 1996). As menores taxas de reprodução de *M. incognita* em soja foram observadas em solos de textura fina (Windham & Barker, 1986). Normalmente, solos com a mesma textura podem ter muitas diferenças com relação à estrutura, com capacidades diferentes de reter umidade, influenciando a aeração e o tamanho do poro do solo, causando impacto na sobrevivência de nematóides parasitas de plantas (Koenning *et al.*, 1996). Wallace (1968) e Van Gundy & Stolzy (1961) correlacionaram a porosidade e a taxa de oxigênio no solo com a sobrevivência de *M. javanica*. Os J2 movem-se entre os espaços das partículas de solo, em que estão as fases líquida e gasosa. Porém, quanto maior é a fase líquida, menor é o nível de oxigênio. Portanto, os nematóides de modo geral apresentam boa

atividade em solos com níveis de umidade entre 40 e 60% da capacidade de campo (Van Gundy, 1985). Em solos muito úmidos, a emergência e o movimento do J2 dentro do ovo são inibidos pela falta de oxigênio (Taylor & Sasser, 1978).

O movimento de J2 de *H. glycines* no solo é melhor em solos com partículas de diâmetro entre 150 e 250µm comparado com aquele entre 75 e 150µm (Young, 1992). Portanto, população alta de *H. glycines* não se mantém em solos com textura fina, e alta concentração de argila (Heatherly & Young, 1991). A textura do solo pode influenciar, também, na incidência e no dano potencial de *H. glycines* em soja. Altas populações de *H. glycines* são encontradas em mais de 70% das lavouras de soja em Missouri onde o solo é arenoso, e esse percentual diminui significativamente em solos com menor concentração de areia (Kocnning *et al.*, 1988). A população inicial tolerável de cistos em solos arenosos chega próximo de zero. Entretanto, em solos com maior concentração de argila e silte, o limite tolerável chega a trinta cistos ou 470 ovos por quilograma de solo (Franel & Dropkin, 1986). Em Tennessee, onde os solos apresentam altos teores de argila e silte esse limite de tolerância é de 200 cistos por litro de solo (Young, 1992).

A reprodução de fitonematóides não depende somente do hospedeiro, mas sim do sucesso da sua movimentação pelo solo, influenciada pelo tamanho dos poros entre as partículas de solo e a espessura do filme de água existente nesses espaços (Ferris & Ferris, 1998).

## **2.2 Influência da temperatura na penetração de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines*.**

Os J2 de certos nematóides parasitas de plantas podem permanecer infectivos no solo por até quatro meses (Van Gundy *et al.*, 1967). Durante este

período as reservas alimentícias vão se esgotando até a uma determinada taxa, em que o J2 não mais penetra no hospedeiro. Este decréscimo dependerá de vários fatores, como temperatura e umidade do solo.

A temperatura é um fator que tem proporcionado grande influência na capacidade de penetração de J2 de várias espécies de *Meloidogyne* (Gourd *et al.*, 1993). Alta taxa de penetração de J2 de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* após 48 horas da inoculação de plantas de soja ocorreu em temperatura média de 25° C (Herman *et al.*, 1991; Gourd *et al.*, 1993; Pedrosa *et al.*, 1996). Em raízes de grão-de-bico, a penetração de J2 de *M. artiellia* não foi boa em temperatura de aproximadamente 30° C, comparada a 15 e 25° C (Di Vito & Greco, 1988). O tempo de penetração de J2 de *Meloidogyne* em soja suscetível varia entre as espécies. *M. incognita* e *M. javanica* penetraram mais quando comparadas com *M. arenaria* e *M. hapla* sob temperaturas entre 25 e 30° C (Gourd *et al.*, 1993). O declínio na taxa de habilidade de uma população de J2 de *Meloidogyne* em encontrar ou penetrar em seu hospedeiro foi de 0,2% por grau-dia, com temperatura base de 10° C (Goodell & Ferris, 1989).

A temperatura durante o desenvolvimento de embriões dentro dos ovos também pode influenciar drasticamente a habilidade do J2 de *Meloidogyne* em infectar seu hospedeiro. No entanto, *M. incognita* e *M. hapla* foram mais eficientes em infectar seus hospedeiros quando os J2 eram provenientes de ovos que sobreviveram em temperaturas de 0° C do que aqueles provenientes de ovos submetidos a diferentes gradientes de umidade (Vrain, 1978). A maior redução da infectividade dos J2 de *M. incognita* em tomateiro ocorreu a partir de 4 dias de privação alimentar sob temperatura de 28° C em solo seco (Dutra, 2002).

A reserva nutricional do J2, aliada à temperatura adequada e à compatibilidade com o hospedeiro, também podem proporcionar maior rapidez de penetração e de estabelecimento do sítio de alimentação (Endo, 1971; Windham & Willians, 1994; Griffin & Jensen, 1997; Anwar & McKenry, 2000).

Entretanto, cultivares de soja considerados resistentes a *M. incognita* podem proporcionar condições favoráveis a penetração dos J2, porém não propiciam uma alimentação adequada, assim desfavorecendo seu desenvolvimento e induzindo a emigração de grande parte desses J2, os quais não sobreviverão devido à baixa reserva alimentícia e perda da capacidade infectiva (Herman *et al.*, 1991).

Para o nematóide de cisto da soja, a temperatura também é um fator físico crucial no seu desenvolvimento. O J2 de *H. glycines* é altamente dependente da temperatura para sua eclosão. Livre no solo, o J2 continua sofrendo o efeito da temperatura. Em temperatura adequada ele é atraído por exsudatos radiculares e penetra na raiz, rompendo a parede celular dos tecidos radiculares através de seu estilete. Induz a formação de sincítia nos tecidos vasculares, estabelecendo o sítio de alimentação (Young, 1992). A penetração na raiz e o desenvolvimento pós-infecção ocorrem numa faixa de temperatura do ar mais ampla do que aquela exigida para eclosão que é de 20 a 30° C (Schmitt & Riggs, 1989). A penetração do J2 de *H. glycines* pode ser completamente limitada em temperaturas abaixo de 14° C ou acima de 35° C, porém a maior taxa de penetração ocorre a 28° C (Hambleton *et al.*, 1972). Segundo Alston & Schmitt (1988), a temperatura mínima para eclosão de *H. glycines* em seus testes foi de 20° C, e não foi favorável para a penetração dos J2 nas raízes de soja. Os autores relataram ainda que temperaturas muito baixas podem afetar a atividade muscular relativa a funções como a eclosão, migração e penetração na raiz. Trabalhos realizados em casa-de-vegetação procurando avaliar a capacidade de penetração ou de infecção de J2 de *H. glycines* têm utilizado temperaturas do ar entre 25 e 30° C (Wrather & Anand, 1988), 25 e 31° C (Gourd *et al.*, 1993), 17,8 e 25,1° C (Valle *et al.*, 1997). Nos resultados obtidos por Diogo *et al.* (1999) a penetração do J2 de *H. glycines* em raízes de soja FT-Cristalina foi satisfatória em temperaturas do ar variando entre mínima de 23,8° C e máxima de 36° C.

Porém, há tendência de redução na penetração em temperaturas mínimas de 17°C. Segundo Cares & Baldwin (1995), nas condições ideais de temperatura do solo (21 a 24° C), *H. glycines* completa o ciclo entre 21 e 25 dias após a penetração. A temperatura pode retardar ou favorecer a penetração do J2 nas raízes, influenciando o tempo necessário para o nematóide completar o seu ciclo de vida na planta hospedeira.

### **2.3 Influência da temperatura no desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines*.**

O período de tempo requerido para a ontogenia e reprodução de *Meloidogyne* é mais influenciado pela temperatura do ambiente do que qualquer outro fator abiótico (Noe, 1991). A temperatura ideal para o desenvolvimento da maioria das espécies de *Meloidogyne* está entre 15 e 30° C (Decker, 1989; Wallace, 1971). De modo geral o ciclo de vida é completado em 25 dias a uma temperatura de 27° C (Agrios, 1997). Mas pode tornar-se mais longo em temperaturas mais elevadas ou mais baixas (Decker, 1989).

A temperatura mínima do solo para o desenvolvimento e reprodução de *M. hapla* varia entre 15 e 20° C. A ótima está entre 20 e 25° C e a máxima de 30° C. No entanto, para *M. javanica* pode-se considerar a adição de 5° C a cada temperatura acima descrita como mínima, ótima e máxima relativa a *M. hapla* (Bird, 1972; Bird & Wallace, 1965). Os efeitos acumulativos causados pelo fator temperatura, em alguma fase de desenvolvimento do nematóide, podem interferir no tempo necessário para completar o seu ciclo de vida (Campos *et al.*, 2001). Em plantas de fumo, *M. javanica* requereu 36 dias para completar o seu ciclo a uma temperatura média do solo de 14,3° C e apenas 21 dias à 26,1° C (Taylor & Sasser, 1978). No entanto, o ciclo de *Meloidogyne* sp. completou-se em 87 dias sob temperatura de 16,5° C (Decker, 1989). Jaehn (1993), constatou

que as melhores temperaturas para o desenvolvimento de *M. incognita* em cafeeiro foram entre 28 a 32°C. Nestas temperaturas, os ciclos se completaram para as raças 1 e 2 em 28 e 32 dias, respectivamente. Já para raça 4, a postura ocorreu aos 36 dias, à temperatura de 32°C. Embora as três raças estudadas tenham o melhor desenvolvimento na mesma faixa térmica de 28 a 32°C, apresentaram constantes térmicas diferentes. Os J2 de *M. incognita* inoculados em tomateiros cultivados sob temperatura de 30 e 35° C, chegaram ao estágio adulto aos 10 dias após a inoculação, e os ovos em 13 dias. A 20° C, fêmeas sem ovos foram observadas aos 19 dias após a inoculação de J2, e 30 dias após a inoculação de ovos. Já a 15° C, fêmeas foram observados aos 38 e ovos aos 60 dias após a inoculação de J2 (Davide & Triantaphyllou, 1967).

Em solo aquecido com temperatura constante de 29 a 30°C, a reprodução de *M. javanica* e de *M. incognita* raça 3 foi maior do que em temperatura de 23 a 24°C, ou casa-de-vegetação com temperatura do solo entre 17 e 34°C. Observou-se, também, que aos 7 dias após o estabelecimento do ensaio, houve maior eclosão de J2 no tratamento com solo aquecido, coincidindo com o maior número de ovos com estágio embrionário avançado (Alves & Campos, 2001). Inomoto *et al.* (1995) também observaram diminuição da resistência de tomateiro com gene *Mi* após ser inoculado com *M. javanica* e mantidos em temperaturas de 29,1 e 32°C.

Em relação a *H. glycines*, a temperatura é também um dos fatores físicos que mais interferem no desenvolvimento e na reprodução (Young, 1992). O desenvolvimento embrionário dentro dos ovos de *H. glycines*, no estágio de duas células até J2, ocorre mais rápido a 24°C do que em temperaturas mais baixas ou mais altas. A taxa de desenvolvimento aumenta linearmente entre 10°C e 24°C, mas decresce a partir de 30°C (Schmitt & Riggs, 1989). As temperaturas próximas a 24°C são mais favoráveis à eclosão, porém esta pode ocorrer entre 20°C e 30°C, atingindo o máximo entre 24° C e 28°C (Hambleton *et al.*, 1972).

Em temperaturas abaixo de 16°C ou acima de 36°C, não há eclosão (Schmitt & Riggs, 1989). Entretanto, a faixa de temperatura para o sucesso no desenvolvimento pós-penetração e reprodução é mais limitada. Anand *et al.* (1995) constataram que a maior taxa reprodutiva de *H. glycines* raças 3, 5 ou 14 foi em temperatura de 26°C, quando comparadas a temperaturas de 20 ou 32°C. Os juvenis não se desenvolvem além do segundo estágio em raízes de soja em condições de temperatura do ar constante ou inferior a 10°C e também a partir de 34°C (Wrather *et al.*, 1984). No Brasil, Silva *et al.* (1996) constataram que as temperaturas baixas durante o inverno são limitantes para a multiplicação do nematóide. De acordo com Hambleton *et al.* (1972) e Schmitt & Noel (1984), após a penetração na raiz, e considerando a temperatura do solo entre 22°C e 29°C durante o ciclo vegetativo da soja, *H. glycines* atinge a maturidade no campo em duas ou três semanas. Já os adultos aparecem entre 12 e 14 dias após a inoculação de J2 em temperaturas variando de 24°C a 31°C (Hambleton *et al.*, 1972). No entanto, em temperaturas semanais variando entre 17°C e 22°C, as fêmeas atingem a maturidade após três a quatro semanas (Alston & Schmitt, 1988).

#### **2.4 Influência da temperatura no desenvolvimento embrionário em ovos de *Meloidogyne* spp.**

A duração do ciclo de vida do *Meloidogyne* é alterada pela temperatura devido ao efeito cumulativo nas diversas fases do desenvolvimento embrionário dentro do ovo, bem como na eclosão e na mobilidade do J2 no solo, retardando a penetração no hospedeiro, ou mesmo no processo de parasitismo do hospedeiro e na reprodução (Lee & Atkinson, 1977; Campos *et al.*, 2001).

A temperatura ótima para o crescimento e reprodução de *M. javanica* varia entre 25 e 30°C. Já a sobrevivência de embriões dentro dos ovos e de J2





ocorre em temperatura do solo entre 10 e 15°C (Van Gundy, 1985). Há também um efeito específico entre espécies quanto a temperatura. Ovos de *M. hapla* desenvolveram embriões a 8°C, o que não aconteceu com *M. incognita* (Vrain & Barker, 1978; Dutra, 2002). Para *M. incognita*, os ovos incubados a 8° C por períodos contínuos causaram inibição do desenvolvimento ou morte desses embriões. A 18° C, os ovos tiveram menor efeito deletério nos embriões. Já a 28° C, ocorreu rápido desenvolvimento embrionar (Dutra, 2002). A taxa de embriogênese em *M. javanica* sob temperatura de 15°C foi aproximadamente 4 a 5 vezes menor do que aquela em 30°C. As condições térmicas ótimas para embriogênese de *M. javanica* estão entre 25 e 30°C (Bird, 1972).

Vrain & Barker (1978) sugeriram que a falta de adaptação do ovo ao meio externo o torna suscetível a injúrias proporcionadas por temperaturas baixas. No entanto, foram observadas anomalias morfológicas no embrião e coagulação do conteúdo do corpo de J2 dentro de ovos de *M. incognita*, avaliados em 47 e 66% dos ovos incubados a 10 e 12°C, respectivamente. Entretanto, tais anomalias não foram observadas em *M. hapla*. A resistência dos embriões e de J2 dentro dos ovos de *M. incognita* ao resfriamento pode ser induzida durante um período de aclimatização. Isto ocorre, talvez, pela diminuição do grau de saturação do lipídio na hipoderme (Vrain, 1978). Os organismos sensíveis ao resfriamento, geralmente possuem lipídios na membrana com alta solidificação a baixa temperatura (Lyons *et al.*, 1975). Maior sobrevivência de embriões e de J2 dentro dos ovos de *M. incognita* e de *M. arenaria* durante o inverno no Texas-EUA foi observada em maior profundidade do solo (Starr & Jeger, 1985), provavelmente pela aclimatização do nematóide durante o resfriamento, que ocorre mais lentamente à medida que se aprofunda no perfil do solo. Embora, ovos incubados a 28° C por período contínuo tiveram um desenvolvimento embrionar rápido, mas o tempo de incubação pode ter acelerado o gasto de energia destes ovos causando maior

perda da infectividade dos J2 (Dutra, 2002). A taxa de mortalidade de embriões foi maior em ovos incubados nas temperaturas de 25 e 30° C do que a 20° C. Porém, a 20° C houve a necessidade de maior tempo para o desenvolvimento até formação do juvenil do primeiro estágio (J1) Bird (1972). Wallace (1971) relatou que 15° C era o limite da faixa ótima de temperatura para a embriogênese em *M. javanica*, contrariando Bird (1972), que observou uma taxa de embriogênese extremamente baixa em ovos incubados a 15° C. Nesta temperatura, a eclosão dos J2 ocorreu entre 44 e 51 dias a partir da incubação de ovos no estágio de duas células. A 30° C esses ovos gastaram de 9 a 10 dias para chegar ao estágio de J2 prontos para eclodir, porém apenas 30% deles eclodiram. Já a 25° C foram gastos de 10 a 13 dias e 70% eclodiram. A 20° C, o tempo foi de 21 a 25 dias e 80% dos J2 eclodiram.

## **2.5 Influência da temperatura na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp.**

Aproximadamente 85% dos ovos de *M. javanica* submetidos à temperatura de 8° C por 30 dias tiveram retardamento da eclosão dos J2, quando comparados àqueles não submetidos a baixa temperatura (Huang & Pereira, 1994). A taxa de eclosão de J2 foi insignificante em temperaturas de 12°C e 15°C para *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente (Bird & Wallace, 1965; Vrain & Barker, 1978; Goodell & Ferris, 1989). A 10° C a eclosão dos J2 de *M. incognita* foi inibida, e passou a ser expressiva entre 16 e 20° C, com uma taxa de ovos anormais ou mortos de 20 a 30%. Nas temperaturas de 10 a 12° C, a taxa de mortalidade de embriões variou de 47 a 66% (Vrain & Barker, 1978). No entanto, para *M. chitwoodi* e *M. hapla* foram observadas taxas de eclosão satisfatórias, mesmo em temperaturas próximas de 10°C (Santo & O'Bannon, 1981).

Em condições de baixas temperaturas, o nematóide pode reduzir o seu metabolismo, induzindo a sobrevivência de J2 ainda dentro do ovo (Lee & Atkinson, 1977). O tempo de exposição do nematóide à baixa temperatura pode influenciar grandemente a capacidade de sobrevivência e, conseqüentemente, o parasitismo em seu hospedeiro (Fan & Hominick, 1991). O período de alqueive no inverno, ou seja, maior tempo de exposição em baixas temperaturas, é mais danoso para a população de *M. arenaria* do que o mesmo período de alqueive no verão, já que a temperatura do solo aumenta a partir da primavera e com a presença da planta hospedeira o desenvolvimento e a reprodução do nematóide são acelerados, aumentando o dano potencial para a cultura (Ornat *et al.*, 1999).

Entretanto, na Itália, estudos com grão-de-bico concluíram que a idade da massa de ovos é um fator de maior importância para a eclosão de J2 de *M. artiellia* do que ovos submetidos a diapausa ou pré-tratamento ao frio, pois a diapausa ou pré-tratamento em baixas temperaturas não influenciaram ou não foram necessários para estimular a eclosão dos J2 (Di Vito & Greco, 1988). Por outro lado, a matriz gelatinosa é constituída de glicoproteínas, assim, os ovos e J2 embebidos nela podem sobreviver melhor quando submetidos a um super resfriamento, a temperaturas abaixo de  $-4^{\circ}\text{C}$  (Vrain, 1978).

## **2.6 Influência da reserva corporal do juvenil do segundo estágio (J2) na penetração, desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne* spp.**

A temperatura é um fator ambiental que controla desde a habilidade do J2 para sair do ovo à sua locomoção e penetração no hospedeiro (Wallace, 1971). Contudo, maior ou menor tolerância do J2 de *Meloidogyne* a temperaturas adversas está relacionada com a concentração de lipídios na hipoderme. Nos fitonematóides, aproximadamente 1/3 do peso seco corporal corresponde a lipídios (Van Gundy, 1985). Nos J2, os lipídios estão localizados

na hipoderme, especialmente nas cordas laterais, nas células da musculatura não contráctil, intestino e ovário. Normalmente, os fitonematóides possuem maiores quantidades de lipídios do que os demais nematóides com outros hábitos alimentares (Lee & Atkinson, 1977).

O J2 de *M. javanica* eclode do ovo e movimenta-se pelo solo com aproximadamente 30% do peso de seu corpo em lipídios, como reserva de energia, a qual é utilizada antes de alcançar o parasitismo na planta. A utilização dessa energia ocorre de acordo com a temperatura, umidade, taxa de oxigênio e outros fatores (Lee & Atkinson, 1977). O consumo das reservas de lipídios em J2 de *M. javanica* foi estimado em 60% após 10 dias de armazenamento em temperatura de 27° C (Van Gundy *et al.*, 1967), 65% após 7 dias a 28° C (Reversat *et al.*, 1980) e 65% após 14 dias em meio líquido a 28° C (Reversat, 1981). O tempo de estocagem aliado às condições do ambiente, são determinantes na manutenção das reservas e, conseqüentemente, na infectividade do J2 (Christophers *et al.*, 1997). A mobilidade e infectividade dos J2 de *M. javanica* armazenados por 5 semanas em meio líquido diluído ( 4 mM de fosfato de sódio com pH 7 ) chegaram a zero com 60% das reservas consumidas (Reversat, 1981). Story (1984) observou que para os J2 de *Globodera rostochiensis* e *G. pallida* armazenados em solo, as perdas das reservas foram mais rápidas do que o armazenamento apenas em água sob temperatura de 20° C.

Segundo Van Gundy (1985), o tempo de pré-tratamento em baixas temperaturas pode ser também um fator importante para a adaptação do nematóide ao resfriamento, sendo que a maior mortalidade de J2 de *Meloidogyne* em temperaturas baixas, está relacionada com a fase de transição na posição de lipídios na hipoderme do nematóide.

## 2.7 Graus-dia no desenvolvimento de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines*.

Na natureza não existe temperatura constante, assim todo o desenvolvimento do nematóide pré e pós-penetração alternam períodos de plena atividade e paralisação total a cada dia e a cada hora. Desta forma, para se quantificar melhor esses processos utilizam-se graus-dia que expressam em dias o somatório de horas com temperaturas favoráveis ao processo que se quer quantificar (Campos *et al.*, 2001).

A biologia do nematóide de galhas, *Meloidogyne* spp., em raiz de planta suscetível foi estudada por Tyler (1933), o qual considerou cada grau celsius agindo durante uma hora como unidade de calor. Em cada período completo do ciclo de *Meloidogyne* spp., somaram-se as temperaturas diárias superiores a partir de uma temperatura base (constante térmica), obtendo-se, assim, os graus-hora ou graus-dia. Assim, no cálculo dessa constante térmica, utilizou-se como base a temperatura de 10° C. Desta forma, estima-se em 13.000 graus-hora ou 541 graus-dia o requerimento térmico para o nematóide *Meloidogyne* spp. Segundo Dropkin (1963), *M. incognita* requer 8280 unidades de calor ou 345 graus-dia em algodão e 12000 unidades de calor ou 500 graus-dia em soja, para completar o ciclo a partir de J2, tomando-se 10° C como temperatura base.

O estudo da temperatura do ar na biologia das raças 1, 2 e 4 de *M. incognita* em cafeeiro, foi feito por Jaehn (1989). Apesar dessas raças estudadas terem o melhor desenvolvimento na faixa térmica de 28 a 32° C, apresentaram constantes térmicas diferentes, isto é, 534, 580 e 718 graus-dia, respectivamente. Também considerando a temperatura do ar, Bost & Triantaphyllou (1982) encontraram 750 graus dia para o desenvolvimento máximo de *M. incognita* e *M. javanica*. No entanto, Alves & Campos (2001) utilizando solo aquecido a 29,3° C, encontrou maior aumento de reprodução de *M. javanica* e *M. incognita*

raça 3 a 12.969 graus-hora, correspondendo a 540 graus-dia. A mortalidade de J2 de *M. incognita* foi reduzida em mais de 90% quando expostos por períodos acima de 500 graus-dia, utilizando temperatura base de 10° C (Goodell & Ferris, 1989).

Em relação ao nematóide do cisto da soja, poucos trabalhos utilizaram graus-dia para determinar condições de temperatura do ar favorável ao desenvolvimento do nematóide. A principal citação é de Alston & Schmitt (1988), os quais observaram a influência de temperatura do ar no desenvolvimento de *H. glycines* raça 1. Os experimentos foram conduzidos entre os meses de maio e outubro, com graus-dia avaliados utilizando temperatura base de 5° C. No período de maio a junho, a temperatura mínima do solo durante o ciclo de vida do *H. glycines* foi de 12° C e a máxima, de 32° C, neste período o desenvolvimento do nematóide ocorreu entre 3 ou 4 semanas, equivalendo a 424 ± 8 graus-dia. Em junho a temperatura mínima do solo foi de 20 a 22° C e a máxima, de 34 a 36° C, e o ciclo completou-se em 4 semanas equivalendo a 534 ± 24 graus-dia. No mês de julho até o início de setembro, a temperatura mínima variou de 20 a 22° C e a máxima, de 30 a 32° C, neste período o ciclo foi completado em 3 semanas, acumulando 429 ± 24 graus-dia, sendo este o melhor intervalo para o desenvolvimento do nematóide. No entanto, Lauritis *et al.* (1982) observaram que, entre 5 e 30° C, a temperatura 25° C foi a que proporcionou um desenvolvimento mais rápido de *H. glycines* raça 3, completando o ciclo em 21 dias, o que corresponde a 420 graus-dia, utilizando 5° C como temperatura base. Um modelo de progressão dos graus-dia desenvolvido para representar o desenvolvimento de ovo ao estágio adulto de *H. glycines* foi descrito por Schneider *et al.* (1989) e teve como temperatura base de 5° C. No intervalo de 5 e 32° C, os autores verificaram uma duração média de 520 graus-dia.

## 2.8 Influência da temperatura na resistência de plantas a *Meloidogyne* spp. e a *Heterodera glycines*.

A resistência da planta em geral não a protege contra a penetração dos J2. Entretanto, após a penetração é que os J2 podem apresentar diferentes tipos de comportamento em genótipos resistentes (Windhang & Willians, 1994; Pedrosa *et al.*, 1996). Desta forma, os J2 podem, simplesmente, voltar ao solo, morrendo logo em seguida ou iniciar seu desenvolvimento pós embrionar, sem desenvolver o primórdio genital, ou mesmo morrer, logo após a penetração, devido às reações necróticas de hipersensibilidade (Moura, 1997, Campos *et al.*, 2001).

Como a duração do ciclo de *Meloidogyne* spp. depende da temperatura e das condições de hospedabilidade da planta, recomenda-se, para estudos de resistência de plantas a nematóides de galhas, um ambiente com temperatura do solo mantidas a 25°C (Taylor & Sasser, 1978). Nesta temperatura, Kaplan *et al.* (1979) constataram, através de estudos histológicos em laboratório, a incompatibilidade da cultivar de soja Centennial e a compatibilidade em Pickett 71 a *M. incognita*, além da compatibilidade de ambos os cultivares a *M. javanica*. A mesma temperatura também foi utilizada por Herman *et al.* (1991) em estudos de penetração e de infectividade de *M. incognita* em raiz de vários genótipos de soja. Outros trabalhos visando avaliar a resistência de genótipos de soja a *Meloidogyne* spp. foram realizados em casa-de-vegetação, onde há grande variação da temperatura do ar e do solo. No entanto, estudos com a cultura do tomateiro (Araujo *et al.*, 1982; Ammati *et al.*, 1986; Haroon *et al.*, 1993; Kaur & Mahajan, 1992 e Alves & Campos, 2001), feijociro (Omwega *et al.*, 1990), batata-doce (Jatala & Russel, 1972), alface e pimentão (Alves & Campos, 2001) já evidenciaram queda na resistência de cultivares ou maior reprodução de *Meloidogyne* em temperaturas altas.

O emprego de cultivares resistentes, aliado a outras táticas de controle, constitui bom manejo de *H. glycines* (Caviness, 1992). No entanto, em função da sua elevada variabilidade intra-específica, esses nematóides apresentam um grande número de raças fisiológicas, aumentando a capacidade de adaptar-se às novas cultivares lançadas (Niblack, 1992). Um esquema proposto por Riggs & Schmitt (1988) permite identificar 16 raças do patógeno. Nos EUA já foram constatadas doze raças (1 a 10, 14 e 15) (Noel, 1992; Kim *et al.*, 1997). No Brasil, Dias *et al.* (2000) relataram a ocorrência das raças 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 14. As novas raças 4+ e 14+ quebraram a resistência da cultivar Hartwing, até então considerada resistente a todas as raças identificadas.

Para a avaliação de cultivares resistentes, Caviness (1992) menciona maior segurança e confiabilidade quando estes testes são realizados em casa-de-vegetação. De acordo com Shannon (1989), os melhores resultados têm sido obtidos quando a temperatura do ar está entre 27 e 29°C. Dias *et al.* (1999) sugerem que a temperatura para os testes em casa-de-vegetação deve estar entre 25 a 30°C. De fato, Anand *et al.* (1995) citam a temperatura, as raças, o genótipo do hospedeiro e a interação entre eles, como fatores significativamente importantes na reprodução de *H. glycines* em soja.



### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4<sup>th</sup>ed. San Diego: Academic, 1997. 635 p.
- ALSTON, D.G.; SCHMITT, D.P. Development of *Heterodera glycines* life stages as influenced by temperature. **Journal of Nematology**, v.20, n.3, p.366-372, 1988.
- ALVES, F.R. **Efeito da temperatura na reprodutividade e no controle biológico de *Meloidogyne javanica* (TREUB) CHITWOOD e *Meloidogyne incognita* raça 3 (KOFOID & WHITE) CHITWOOD**. 2000. 98p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ALVES, F.R.; CAMPOS, V.P. Efeito do aquecimento do solo na resistência de plantas a *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 153-162, 2001.
- AMMATI, M.; THOMASON, I.J.; MCKINNEY, H.E. Retention of resistance to *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon* genotypes at high soil temperature. **Journal of Nematology**, Raleigh, v. 18, n. 4, p. 491-495, Oct. 1986.
- ANAND, S.C.; MATSON, K.W.; SHARMA, S.B. Effect of soil temperature and pH on resistance of soybean to *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 27, n. 4, p. ,Dec. 1995.
- ANWAR, S.A.; MCKENRY, M.V. Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resistant *Vitis* spp. **Nematropica**, v.30, n.1, p.9-17, 2000.
- ARAÚJO, M.T. et al. Effect of diurnal changes in soil temperatures on resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato. **Journal of Nematology**, Gainesville, v. 14, n. 3, p. 414-416, July 1982.
- BIRD, A.F. Influence of temperature on embryogenesis in *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, v.4, p. 206-213, 1972.
- BIRD, A.F.; WALLACE, H.R. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, v.11, p. 581-589, 1965.

BOST, S.C.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Genetic basis of the epidemiologic effects of resistance to *Meloidogyne incognita* in the tomato cultivar Small Fry. *Journal of Nematology*, Raleigh, v. 14, n. 4, p. 540-544, Oct. 1982.

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

CARES, J.E; BALDWIN, J.G. Nematóides formadores de cisto do gênero *Heterodera*. *Revisão Anual de Fitopatologia de Plantas*, Passo Fundo, v.3, p.29-84, 1995.

CAVINESS, C.E. Breeding for resistance to soybean cyst nematode. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St. Paul: APS, 1992. p. 143-156.

COOPER, A.F.; VAN GUNDY, S.D. Senescence, quiescence, and cryptobiosis. In: ZUCKERMAN, B.M.; MAI, W.F.; ROHDE, R.A. **Plant parasitic nematodes**. New York: Academic, 1971. v.2, p.297-318.

CHRISTOPHERS, A.E.P. et al. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. *Nematologica*, v. 43, p. 117-120, 1997.

DAVID, R.G.; TRIANTAPHILLOU, A.C. Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes. 1. Effect of infection density, age of host plant, and soil temperature. *Nematologica*, v. 13, p. 102-110, 1967.

DECKER, H. **Plant nematodes and their control (Phytonematology)**. New York: Brill, 1989. 540p.

DI VITRO, M.; GRECO, N. Investigation on the biology of *Meloidogyne artiella*. *Revue de Nématologie*, v.11, n.2, p.223-227, 1988.

DIAS, W.P.; GARCIA, A.; SILVA, J.F.V. Nematóides associados à cultura da soja no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 22., 2000, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2000. p.59-65.

DIAS, W.P. et al. Distribuição de raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA. **O nematóide de cisto da soja: a experiência brasileira**. Jaboticabal: Artsingner Editores, 1999. p. 95-103.

DIOGO, A.M. et al. Penetração e reprodução de *Heterodera glycines*, raça 3, em algumas espécies vegetais. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.24-33, 1999.

DROPKIN, V.H. Effect of temperature on growth of root-knot nematodes in soybean and tobacco. **Phytopathology**, St. Paul, v. 53, p. 663-666, 1963.

DROPKIN, V.H. Nematode parasites of plants, their ecology and the process of infection. In: HERTEFUSS, R.; WILLIAMS, P.H. **Physiological plant pathology**. New York: 1976, p. 222-246.

DUTRA, M.R. Manejo do solo e da água no controle de nematóides de galhas (*Meloidogyne* sp.) e estudos "in vitro" da temperatura e umidade na infectividade desses patógenos. 2002. 131p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologia de produção de soja-região central do Brasil 2003**. Londrina: Embrapa Soja/Embrapa Cerrado/Embrapa Agropecuária Oeste/ESALQ, 2002. 199 p.

ENDO, B.Y. Nematode-induced syncytia (giant cells). Host-parasite relationships of Heteroderidae. In: ZUCKERMAN, B.M.; MAI, W.F.; ROHDE, R.A. **Plant parasitic nematodes**. New York: Academic, 1971. v.2, p.91-117.

FAN, X.; HOMINICK, W.M. Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two *Steinernema* species (Nematoda: Steinernematidae). **Revue de Nématologie**, v. 14, n.3, p.407-412, 1991.

EVANS, A.A.F. Diapause in nematodes as a survival strategy. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p.180-187.

FERRIS, J.M.; FERRIS, V.R. Biology of plant-parasitic nematodes. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. **Plant and nematode interactions**. Hardcover: American Society of Agronomy, 1998, p. 21-35.

FONSECA, H.S.; JAEHN, A. Influencia da temperatura no desenvolvimento embrionário de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.22, n.2, p.32, 1998.

FRANEL, L.S.; DROPKIN, V.H. *Heterodera glycines* population dynamics and relation of initial population to soybean yield. **Plant Disease**, v. 70, p. 791-795, 1986.

GOODELL, P.B.; FERRIS, H. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, v.21, n.3, p.328-334, 1989.

GOURD, T.R.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R. Penetration rates by second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. **Journal of Nematology**, Raleigh, v. 25, n. 1, p. 38-41, 1993.

GRIFFIN, G.D.; JENSEN, K.B. Importance of temperature in the pathology of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi* on legumes. **Journal of Nematology**, v.29, n.1, p.112-116, 1997.

HAMBLEM, M.L.; SLACK, D.A.; RIGGS, R.D. Temperature effects on penetration and reproduction of soybean-cyst nematode. **Phytopathology**, v. 62, p. 762, 1972.

HAROON, S.A.; BAKI, A.A.; HUETTEL, R.N. An *in vitro* test for temperature sensitivity and resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 25, n. 1, p. 83-88, Mar. 1993.

HEATHERLY, L.G.; YOUNG, L. D. Soybean and soybean cyst nematode response to soil water content in loam and clay soil. **Crop Science**, v. 31, p. 191-196, 1991.

HERMAN, M.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v. 23, n. 2, p. 155-161, 1991.

HUANG, S.P.; PEREIRA, A.C. Influence of inoculum density, host, and low-temperature period on delayed hatch of *Meloidogyne javanica* eggs. **Journal of Nematology**, v.26, n.1, p.72-75, 1994.

INIMOTO, M. M. et al. Effect of soil temperature on tomato resistance to *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.21, n. 2, p. 175-177, 1995.

JAEHN, A. Efeito da temperatura na biologia de três raças de *Meloidogyne incognita* (Tylenchida – Meloidoginidae) em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e estimativa do número de gerações para o estado de São Paulo. 1989. 101p. Tese (Doutorado em Entomologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

JAEHN, A. Efeito da temperatura no desenvolvimento de *Meloidogyne incognita* raça 2 em mucuna preta. *Nematologia Brasileira*, Campinas, v. 17, n. 1, 1993.

JATALA, P.; RUSSEL, C.C. Nature of sweet potato resistance to *Meloidogyne incognita* and the effects of temperature on parasitism. *Journal of Nematology*, Raleigh, v. 4, p. 1-7, Jan. 1972.

KAPLAN, D.T.; THOMASON, J.J.; VAN GUNDY, S.D. Histological study of the compatible and incompatible interaction of soybeans and *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, v. 11, n.4, p.338-343, 1979.

KAUR, D.J.; MAHAJAN, R. Effect of two temperature regimes on the expression of resistance to *Meloidogyne incognita* in resistant tomato cultivars. *Nematologia Mediterrânea*, Bari, v. 20, n. 2, p. 221-222, Dec. 1992.

KIM, D.G. et al. Distribution of races of *Heterodera glycines* in the central United States. *Journal of Nematology*, Florida, v. 29, n. 2, p. 173-179, June 1997.

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, p.373-380, 1988.

KOENNING, S.R.; WALTERS, S.A.; BARKER, K.R. Impact of soil texture on the reproductive and damage potentials of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* on cotton. *Journal of Nematology*, v. 28, n.4, p.527-536, 1996.

LAURITIS, J.A.; REBOIS, R.V.; GRANNEY, L.S. Technique for gnotobiotic cultivation of *Heterodera glycines* Ichinohe on *Glycine max* (L.) Merr. *Journal of Nematology*, v.14, n.3, p. 422-424, July 1982.

LEE, D.L.; ATKINSON, H.J. *Physiology of nematodes*. New York: Columbia University, 1977. 215p.

LYONS, J.M.; KEITH, A.D.; THOMASON, I.J. Temperature-induced phase transitions in nematode lipids and their influence on respiration. **Journal of Nematology**, v.7, p.98-104, 1975.

MOURA, R.M. O gênero *Meloidogyne* e a meloidogynose. Parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.5, p.281-315, 1997.

NIBLACK, T.L. The race concept. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St. Paul: APS, 1992. p. 73-86.

NOE, J.P. Development of *Meloidogyne arenaria* on peanut and soybean under two temperature cycles. **Journal of Nematology**, Athens, v. 23, n. 4, p. 468-476, 1991.

NOEL, G.R. History, distribution and economics. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St.Paul: APS, 1992. p.1-13.

OMWEGA, C.O.; THOMASON, J.I.; ROBERTS, P.A. Effect of temperature on expression of resistance to *Meloidogyne* spp. in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v.22, n. 4, p. 446-451, Oct. 1990.

ORNAT, C. et al. Effect of fallow and root destruction on survival of root-knot and root-lesion nematodes in intensive vegetable cropping systems. **Nematropica**, v.29, n.1, p.5-16, 1999.

PEDROSA, E.M.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. Penetration and post-infectious development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* raça 1 and 2 on susceptible and resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 343-351, 1996.

PERRY, R.N. Host-Induced hatching of phytoparasitic nematode eggs. In: VEECH J.A.; DICKSON, D.W. **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p.159-164.

PROT, J.C.; VAN GUNDY, S.D. Influence of photoperiod and temperatura on migration of *Meloidogyne* juvenil. **Journal of Nematology**, v.13, p. 217-219, 1981.

QIU, L.; BEDDING, R.A. Energy metabolism and survival of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under oxygen-deficient conditions. *Journal of Nematology*, v.32, n.3, p.271-280, 2000.

REVERSAT, G. Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions inducing osmobirosis. *Nematologica*, v.27, p. 207-214, 1981.

REVERSAT, G. et al. A photographic technique to evaluate the consumption of food reserves in individual starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica*. *Revue Nématologie*, v. 3, p.101-105, 1980.

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

SANTO, G.S.; O'BANNON, J.H. Effect of soil temperature on the pathogenicity and reproduction of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* on Russet Burbank potato. *Journal of Nematology*, v.13, p. 483-486, 1981.

SCHMITT, R.D. Population dynamics. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St.Paul: APS, 1992. p. 51-59.

SCHMITT, D.P.; NOEL, G.R. Nematodes parasites of soybean. In NICKLE, W.R. (Ed.). **Plant and insect nematodes**. New York: M. Dekker, 1984. p. 13-59.

SCHMITT, R.D.; RIGGS, R.D. Population dynamic and management of *Heterodera glycines*. *Agricultural Zoology Reviews*, v.3, p. 253-269, 1989.

SCHNEIDER, S.M.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R. A distributed development model of soybean cyst nematode. *Journal of Nematology*, v. 21, p. 587, 1989. Abstract.

SHANNON, J.G. Breeding for resistance to races of soybean cyst nematode. In: **WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE**, 4., 1987, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: Asociacion Argentina de la Soja, 1989. p. 2071-2076.

SILVA, J.F.V. et al. **Contribuição ao desenvolvimento de linhagens de soja com resistência a patógenos**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. 43 p. ( Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1 ).

SILVA, J.A.L. da. et al. Desenvolvimento de uma câmara de crescimento térmico para multiplicação do nematóide de cistos da soja (*Heterodera glycines*, ichinohe) no inverno. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 43, n. 247, p. 237-244, 1996.

STARR, J.L.; JEGER, M.J. Dynamics of winter survival of eggs and juveniles of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **Journal of Nematology**, v.17, n.3, p. 252-256, 1985.

STORY, R.M.J. The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* spp. **Annual Applied Biology**, v. 104, p. 511-520, 1984.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, Identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: North Carolina State University, 1978. 111p.

TYLER, J. Development of the root-knot nematode as affected by temperature. **Hilgardia**, Oakland, v.7, n.10, p. 391-413, Apr. 1933.

VALLE, L.A.C. do.; FERRAZ, S.; TEIXEIRA, D.A. Estimulo à eclosão de juvenis, penetração e desenvolvimento de *H. glycines* nas raízes de mucuna preta (*Mucuna atenima*) e guandu (*Cajanus cajan*). **Nematologia Brasileira**, Pelotas, v.21, n.1, p.67-83, 1997.

VAN GUNDY, S.D. Ecology of *Meloidogyne* spp.- emphases on enviromental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Raleigh: North Carolina, 1985. v.1, p.177-182.

VAN GUNDY, S.D.; BIRD, A.F.; WALLACE, H.R. Ageing and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, v.57, p. 559-571, 1967.

VAN GUNDY, S.D.; STOLZY, L.H. Influence of soil oxygen concentrations on the development of *Meloidogyne javanica*. **Science**, v. 134, p.665-666, 1961.



VRAIN, T.C. Influence of chilling and freezing temperatures on infectivity *Meloidogyne incognita* and *M. hapla*. **Journal of Nematology**, v.10, n.2, p.177-180, 1978.

VRAIN, T.C.; BARKER, K.R. Influence of low temperature on development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* eggs in eggs masses. **Journal of Nematology**, v.10, n.4, p.311-313, 1978.

WALLACE, H.R. The influence of aeration on survival and hatch of *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, v.14, p. 223-230, 1968.

WALLACE, H.R. Abiotic influences in the soil environment. In: ZUCKERMAN, B.M., MAI, W.F.; ROHDE, R.A. **Plant parantic nematodes**. New York: Academic, 1971. v.1, p. 257-280.

WINDHAM, G.R.; BARKER, K.R. Effects of soil type on the damage potential of *Meloidogyne incognita* on soybean. **Journal of Nematology**, v.18, p. 331-338, 1986.

WINDHAM, G.L.; WILLIAMS, W.P. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible corn genotypes. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v. 26, n. 1, p. 80-85, Mar. 1994.

WRATHER, J.A.; ANAND, S.C. Relationship between time of infection with *Heterodera glycines* and soybean yield. **Journal of Nematology**, v.20, n.3, p.439-442, 1988.

WRATHER, J.A.; ANAND, S.C.; DROPKIN, V.H. Soybean cyst nematode control. **Plant Disease**, v.68, p. 829-833, 1984.

WRATHER, J.A. et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, v.81, n.1, p.107-110, Jan. 1997.

WRIGHT, D.; PERRY, R.N. Musculature and neurobiology. In: PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. New York: CABI, 1998. p.49-73.

YOUNG, L.D. Epiphytology and life cycle. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St.Paul: APS, 1992. p. 27-36.

## **CAPÍTULO 2**

**Efeito do tempo, substrato e temperatura na penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines*.**

## 1 RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Efeito do tempo, substrato e temperatura na penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines*. In: \_\_\_\_\_. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. 2003. Cap. 2. p. 28-48. Tese (Doutorado em Fitopatologia)—Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Observou-se que, independente do substrato, aos 2 dias após a inoculação a penetração de J2 de *M. javanica* nas raízes da soja foi baixa em comparação com os demais períodos. Em areia fina, maior penetração ocorreu aproximadamente aos 4,4 dias após a inoculação. Na mistura de solo + areia grossa, houve aumento do número de J2 a partir dos 2 dias até 8 dias após a inoculação. Para *H. glycines*, na areia fina o número de J2 observado no interior das raízes foi alto aos 2 dias da inoculação, seguido de redução nos demais períodos avaliados. Na mistura de solo + areia grossa, houve aumento do número de J2 de *H. glycines* na raiz a partir dos 2 dias após a inoculação. Na temperatura de 24° C ocorreu maior ( $P \leq 0,05$ ) penetração de J2 de *M. javanica* indiferente da resistência da cultivar. Entretanto, na cultivar resistente a penetração não foi alterada ( $P \leq 0,05$ ) na temperatura de 28° C. A 32° C ocorreu queda significativa chegando a 17,97% daquela em 28° C e semelhante àquelas a 16 e 20° C. Na cultivar suscetível a queda na penetração foi significativa já aos 28° C e se manteve constante em 32° C, ocorrendo queda de 34,74% em relação a 24° C, porém foi ainda mais elevada ( $P \leq 0,05$ ) do que em 16 e 20° C. A 12° C não ocorreu penetração em qualquer cultivar testada. Para *H. glycines*, a temperatura de 21,3° C proporcionou maior penetração de J2 na cultivar suscetível, e a 22,4° C maior penetração na resistente. A redução na penetração a 12 e 32° C foi semelhante e também indiferente da reação hospedeiro, porém correspondendo aproximadamente à metade daquela temperatura com máxima penetração. Em temperatura de 12° C, os J2 de *H. glycines* penetraram nas raízes das cultivares testadas em proporções semelhantes aquelas observadas na de 32° C.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Effect of timing, substract and temperature on the penetration of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines* in soybean roots. In: \_\_\_\_\_. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. Cap. 2. p. 28-48. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Independently of the substract, was observed, at 2 days after inoculation, lower penetration of J2 of *M. javanica* compared to other time periods amounting. By using fine sand, greater penetration of J2 of *M. javanica* in soybean roots occurred at 4,4 days after inoculation. By using mixture of soil and ground sand, the numbers of J2 of *M. javanica* in soybean roots increase from the 2 days up to 8 days after inoculation. To *H. glycines*, when fine sand was used, the number of J2 observed in the roots was higher at 2 days after inoculation, followed by reduction in other time periods amounting. By using the mixture of soil and ground sand, there increase of number of J2 of *H. glycines* in the root starting from 2 days after inoculation. At 24° C temperature occurred greater ( $P \leq 0,05$ ) penetration of J2 of *M. javanica* unlikely to cultivar resistance. However, in the resistant cultivar the penetration was not altered ( $P \leq 0,05$ ) at 28° C temperature. At 32° C occurred significant decrease reaching to 17,97% of that at 28° C and similar to that at 16 and 20° C. In the susceptible cultivar the penetration decrease was significant at 28° C and followed the same at 32° C, amounting to 34,74% of that at 24° C, and even greater than that at 16 and 20° C. At 12° C penetration was not observed in any tested cultivar. To *H. glycines*, the temperatures of 21,3° C provided larger penetration of J2 in susceptible cultivar, and 22,4° C in resistant cultivar. The reduction on penetration of J2 at 12 and 32° C was similar and also unlike of host reaction, but corresponding approximately the half of that at the temperatures of 16 and 28° C. At temperature of 12° C the J2 of *H. glycines* penetrated in roots of tested cultivar at the same rate as at the 32° C.

---

\* Guidance Commitee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Edson Apélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

A penetração do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. e de *Heterodera glycines* no hospedeiro inicia o processo de parasitismo e o desenvolvimento pós embrionário do nematóide. A penetração é um processo que se inicia com o movimento do nematóide no solo e a atração pelo local de penetração na raiz (Endo, 1975; Hussey & Grundler, 1998).

Uma vez na superfície da raiz, a penetração do J2 dependerá das condições de temperatura, umidade local e das suas próprias condições de patogenicidade. Desta forma, vários fatores estão envolvidos neste processo. A temperatura e umidade afetam a penetração de várias espécies de *Meloidogyne* e de *H. glycines* (Prot & Van Gundy, 1981b; Herman *et al.*, 1991; Hambleton *et al.*, 1972; Diogo *et al.* 1999). Entretanto, muitas populações através dos anos se adaptaram a determinadas condições climáticas. Nos países tropicais essas alterações podem ser mais evidenciadas.

O substrato ou o tipo de solo afeta a migração do J2 de *Meloidogyne* e de *H. glycines* (Wallace, 1971; Prout & Van Gundy, 1981a; Koenning *et al.*, 1988; Koenning *et al.*, 1996).

A condição do hospedeiro pode afetar a penetração. Herman *et al.* (1991) encontraram maior penetração de *M. incognita* em plantas de soja suscetíveis do que em resistentes aos 8 dias após a inoculação de J2. Entretanto, tem-se encontrado, em algumas cultivares resistentes de soja, emigração do J2 de *H. glycines* raça 5 após 48 horas da inoculação (Gourd *et al.*, 1993), portanto, questiona-se sobre esse fenômeno também nas suscetíveis. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o tempo para penetração de J2 de *M. javanica* e de *H. glycines* raça 3 em soja crescida sobre dois tipos de substratos e

**o efeito de diferentes temperaturas na capacidade de penetração em cultivares suscetíveis e resistentes de soja.**



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines*

*M. javanica* foi multiplicado em soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cultivar Embrapa 20 (Doko RC), e mantida em vasos em casa-de-vegetação. Raízes galhadas foram coletadas e os ovos foram extraídos utilizando a técnica de Hussey & Barker (1973). A suspensão de ovos livres de impurezas foi colocada em câmara de eclosão e mantida em temperatura de  $26 \pm 2^\circ$  C. Os J2 obtidos durante as primeiras 24 e 48 horas foram descartados e utilizados aqueles produzidos com 72 horas de incubação.

O inóculo utilizado de *H. glycines* foi a raça 3, a qual foi confirmada através de testes em cultivares e linhagens diferenciadoras, conforme descrito por Niblack (1992). A população do nematóide foi multiplicada em plantas de soja, cultivar Embrapa 20 (Doko RC) e mantida em vasos de argila em casa-de-vegetação. Para obter o inóculo plantas de soja foram infestadas com ovos da raça 3 de *H. glycines*. Trinta dias após, as plantas infestadas foram retiradas dos vasos, os sistemas radiculares foram colocados em peneira de 0,85 mm, sobreposta à de 0,18 mm, e direcionados jatos de água que deslocaram as fêmeas e cistos. Para obtenção dos ovos dos cistos foi utilizada a metodologia descrita por Dias *et al.* (1999), na qual as fêmeas e cistos eram rompidos pressionando um Becker sobre eles na própria peneira de 0,18 mm, apoiada a uma de 0,025 mm. Desta forma, os ovos eram recolhidos na peneira de 0,025 mm e submetidos a uma centrifugação em solução de sacarose composta de 454 g de açúcar por litro de água, a 2000 rpm por 1 minuto, visando separá-los das impurezas. Para obter os J2, os ovos foram colocados em câmara de eclosão e mantidos à temperatura de  $26 \pm 2^\circ$  C. Os J2 produzidos nas primeiras 24 e 48

horas de incubação foram descartados, utilizando-se aqueles com 72 horas.

#### 4.2 Efeito do tempo e de substrato na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* em raízes de soja.

Sementes de soja da cultivar Embrapa 20 foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto e colocadas para germinar em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada à  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ . Três dias após as sementes germinadas com radícula de 2 cm foram transferidas para tubos de ensaio contendo  $30 \text{ cm}^3$  de areia fina quartizífera ou mistura de solo e areia grossa na proporção de 2: 1, umedecidos, e previamente autoclavada a uma temperatura de  $120^\circ \text{C}$  por 20 minutos. Vinte quatro horas após, infestou-se o substrato de cada tubo com 200 J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines*, mantendo-os em sala climatizada com temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Aos 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação, as plântulas foram retiradas jorrando água nas paredes dos tubos. As raízes e a areia contidas nos tubos foram lavadas sobre um conjunto de peneiras de 0,44 mm sobreposta a de 0,025 mm. O material retido na peneira de 0,025 mm foi recolhido com sacarose (454g de açúcar por litro de água) em tubos de centrifuga, e centrifugados a 1700 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi vertido em peneira de 0,025 mm, enxaguado e recolhido em câmara de contagem. A seguir, quantificou-se o número de J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines* recuperados no substrato. Os sistemas radiculares lavados foram submetidos ao clareamento dos tecidos em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 6 minutos, e enxaguados em água corrente. Em seguida, foram transferidos para tubos de vidro onde foi adicionada uma solução corante diluída até cobrir as raízes, preparada com 3,5 gramas de fucsina ácida + 250 mL de



ácido láctico + 750 mL de água destilada (adaptado de Byrd *et al.*, 1983) e diluída 1: 29 (1 mL de solução corante inicial + 29 mL de água destilada). Em seguida, as raízes imersas no corante foram mantidas por 2 minutos em banho-maria com água em ebulição. O resfriamento total foi feito em condições ambiente durante a noite. As raízes foram, então, lavadas para eliminar o excesso de corante e recolocadas nos tubos. Cobriram-se todas as raízes com solução de glicerina 1:1 (glicerina pura + água destilada), as quais foram deixadas em repouso por, no mínimo, duas horas. Em seguida, todas as raízes foram colocadas em lâmina de vidro, adicionando-se sobre elas gotas de glicerina pura. Outra lâmina de vidro foi sobreposta a ela, a qual estava, então, pronta para observação ao microscópio de objetiva invertida. Quantificou-se o número de J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines* dentro de cada segmento radicular.

Foi empregado o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com fatorial 2 x 4, utilizando-se 2 tipos de substrato e 4 épocas de avaliação após a inoculação de cada nematóide, em 6 repetições.

#### **4.3 Efeito de temperatura na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* em raízes de soja.**

Tubos de ensaio com plantas das cultivares Embrapa 20 (suscetível a *M. javanica* e *H. glycines*), MGBR-46 (resistente a *M. javanica*) e BRSMG Liderança (resistente a *H. glycines* raça 3) em arcia quartizífera foram obtidos como descrito. Vinte quatro horas, após o transplântio das sementes germinadas para os tubos, infestou-se o substrato de cada tubo com 100 J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines*. Em seguida, foram transferidos para câmaras ou BODs com temperaturas fixas de 12, 16, 20, 24, 28 ou 32° C.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, em fatorial 2 x

6, com duas cultivares e 6 temperaturas fixas, em 6 repetições, para *M. javanica* ou para *H. glycines*.

Aos 4 dias após a inoculação, quantificou-se o número de J2 recuperados na areia e os J2 dentro no sistema radicular, como anteriormente descrito.

A análise de variância assim como as regressões foram realizadas com o programa SAS User'S guide: statistics, version 8 (SAS Intitute Inc., Cary, USA, 1999). As fontes de variação significativas pelo teste F foram empregadas para construir os modelos de regressão. Em seguida foram plotadas as curvas, e os pontos de máxima foram obtidos pela derivada das equações, a qual foi igualada a zero. A fonte de variação sem ajuste de modelos empregou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparar as médias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do tempo e de substrato na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em raízes de soja.

Numa análise global, observou-se que, independente do substrato, aos 2 dias após a inoculação a penetração de J2 de *M. javanica* nas raízes da soja foi baixa em comparação com os demais períodos (Figura 1). Em areia fina, de acordo com o ponto de máximo da equação, aproximadamente aos 4,4 dias após a inoculação houve maior penetração de J2 por sistema radicular com redução acentuada após esse período. No substrato solo + areia grossa houve aumento do número de J2 penetrados até no 8º dias após a inoculação (Figura 1).

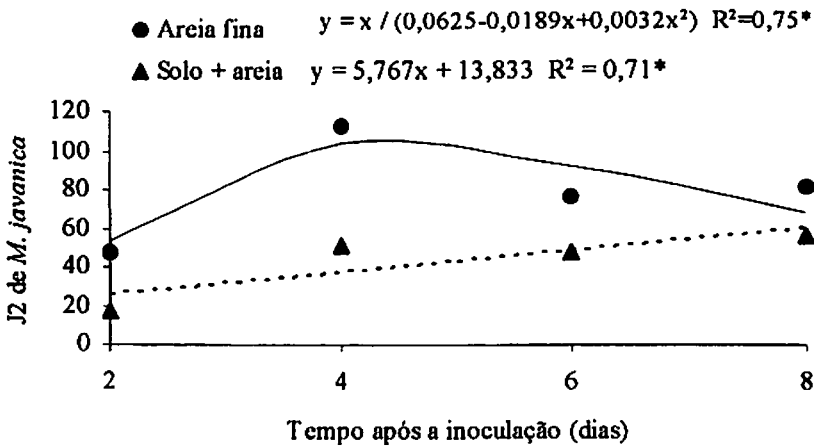


FIGURA 1- Efeito do tempo após a inoculação na penetração do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em raiz de soja suscetível em substratos diferentes.

O número de J2 de *M. javanica* recuperados no substrato solo + areia grossa foi maior do que aquele recuperado na areia fina (Figura 2). Entretanto, nos dois substratos testados houve redução acentuada na recuperação dos J2 após 2 dias da inoculação, com tendência de estabilização na recuperação de J2 após os 4 dias da inoculação em ambos os substratos (Figura 2). De modo geral, a medida que a penetração aumentou houve tendência de queda no número de J2 recuperados no substrato.

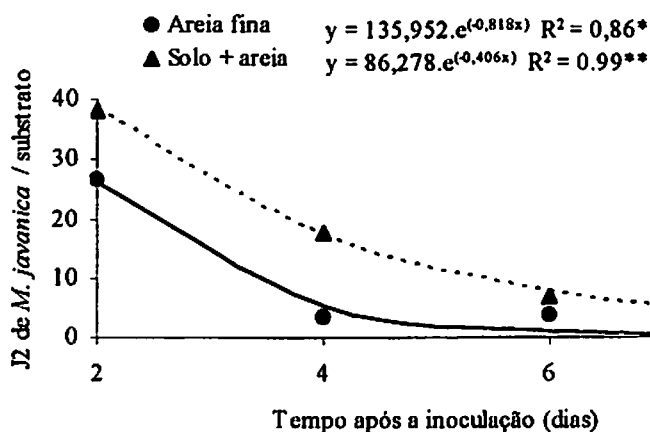


FIGURA 2- Efeito do tempo após a inoculação na recuperação de juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* nos substratos areia fina quartzífera ou solo + areia grossa.

O pequeno número de J2 de *M. javanica* dentro da raiz da soja aos 2 dias indica, talvez, pequena eficiência da propagação do fator atrativo ao J2 emanado do local de penetração, aliado à especificidade desse local, pois os J2 só penetram na ponta da raiz nova. Alguns pesquisadores têm preferido avaliar penetração a partir do quarto ou quinto dia da inoculação (Herman *et al.*, 1991; Gourd *et al.*, 1993; Pedrosa *et al.*, 1996). A queda no número de J2 dentro da

raiz aos 6 dias comparada com aquele número aos 4 dias, não concorreu em aumentar o número de J2 na areia fina. Provavelmente não houve emigração, mas sim ineficiência no processo de parasitismo (Figura 1 e 2). Gourd *et al.* (1993) encontraram 28 e 18% de penetração de J2 de *M. arenaria* e *M. hapla*, respectivamente, em raiz de soja, aos 10 dias após a inoculação, e 23 e 25% para *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente, aos 5 dias após a inoculação. Contudo, aos 2 dias após a inoculação houve tendência de redução na penetração, quando esses valores foram de 20 e 23%, respectivamente. Mais de 50% dos 500 J2 de *M. arenaria* inoculados em mudas de videira suscetível foram encontrados nas raízes aos 4 e 13 dias da inoculação (Anwar & McKenry, 2000). O número de J2 de *M. incognita* em raiz da cultivar de soja suscetível aumentou significativamente após 4 dias da inoculação. Porém, isto não aconteceu com as cultivares resistentes, que mantiveram baixo número de J2 na raiz até 16 dias da inoculação (Herman *et al.*, 1991).

Para *H. glycines*, na areia fina a maior penetração de J2 nas raízes de soja ocorreu aos 2 dias após a inoculação, com queda a partir desta data até aos 4 dias (Figura 3). Ao contrário, na mistura de solo + areia grossa, o menor número de J2 nas raízes foram observados aos 2 dias após a inoculação, com tendência de aumento até aos 8 dias após a inoculação (Figura 3). O número de J2 recuperados no substrato areia fina foi semelhante em todos os períodos avaliados (Figura 4). Entretanto, na mistura de solo + areia grossa houve tendência de redução na recuperação de J2 após 2 dias da inoculação até o 8º dia.

20), a queda na penetração foi significativa já aos 28° C e se manteve constante em 32° C, ocorrendo 34,74% daquela a 24° C, porém ainda mais elevada ( $P \leq 0,05$ ) do que em 16 e 20° C (Figura 5). A 12° C não ocorreu penetração em qualquer cultivar testada (Figura 5).

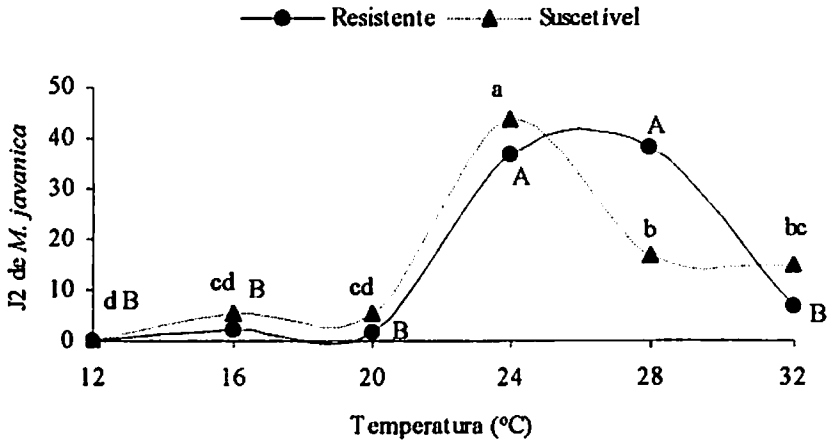


FIGURA 5- Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em raízes de cultivares de soja resistente (MGBR-46) e suscetível (Embrapa 20) crescidas em diferentes temperaturas, após 4 dias da inoculação. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Considerando que a 12° C não ocorreu penetração de J2 de *M. javanica*, a utilização de 10° C como temperatura base para cálculo de graus-dia, como utilizado por Goodell & Ferris (1989), não parece ser conveniente.

Acima de 24° C a temperatura para a penetração dos J2 nas raízes de soja ainda pode variar entre espécies de *Meloidogyne*. Gourd *et al.* (1993), trabalhando com as espécies *M. incognita* e *M. javanica*, observaram boa capacidade de penetração em soja suscetível em temperatura variando entre 25° C e 31° C. Resultados semelhantes foram obtidos por Pedrosa *et al.* (1996),

quando avaliaram a penetração de *M. arenaria* raças 1 e 2 em genótipos de soja suscetíveis e resistentes nesta faixa de temperatura. No entanto, Herman *et al.* (1991) avaliaram a penetração de *M. incognita* também em cultivares suscetíveis e resistentes de soja apenas em temperatura de 25° C, e observaram altas taxas de penetração até aos 4 dias da inoculação em ambas os cultivares. Em raízes de grão-de-bico, Di Vito & Greco (1988) observaram que a penetração de *M. artiellia* não foi satisfatória em temperatura de 30° C, quando comparada a 15 e 25° C. Contudo, de forma generalizada, Taylor & Sasser (1978) e Van Gundy (1985) sugeriram a faixa de temperatura entre 25 e 30° C como ideal para a penetração de *M. javanica* em seu hospedeiro.

Para *H. glycines* as temperaturas entre 16 e 28° C proporcionaram boa penetração de J2, independente da resistência ou suscetibilidade da cultivar testada (Figura 6). No entanto, a máxima penetração ocorreu a 21,3° C na cultivar suscetível e a 22,5° C na cultivar resistente. A redução na penetração a 12 e 32° C foi semelhante e também indiferente da reação hospedeiro, porém correspondendo aproximadamente a metade daquele nas temperaturas entre 16 e 28° C. Em temperatura de 12° C os J2 de *H. glycines* penetraram nas raízes das cultivares testadas nas mesmas proporções que na de 32° C (Figura 6).

A reação do hospedeiro caracterizada em resistência e suscetibilidade, não afetou a penetração, indicando que o mecanismo que confere resistência é ativado após a penetração. Schmitt & Riggs (1991) também encontraram proporções semelhante de penetração de *H. glycines* raça 3 em cultivares resistentes e suscetíveis de soja .

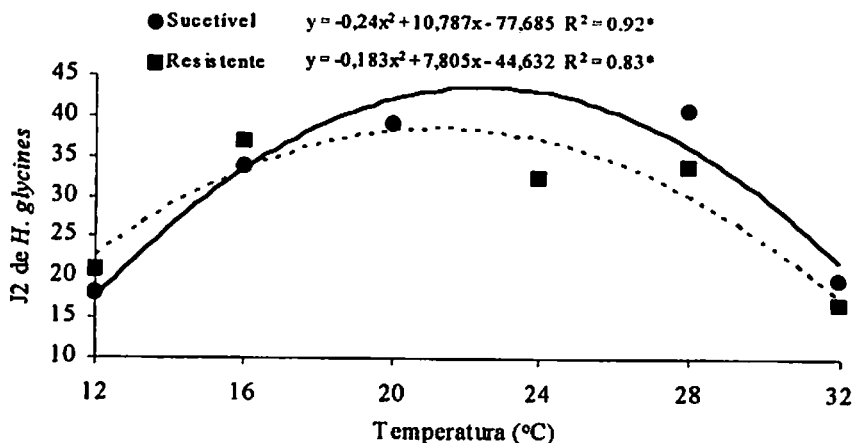


FIGURA 6- Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines* penetrados em raízes de cultivares de soja resistente (BRSMG Liderança) ou suscetível (Embrapa 20), crescidas em diferentes temperaturas, após 4 dias da inoculação.

Segundo Hambleton *et al.* (1972) e Schmitt & Riggs (1989) a penetração de *H. glycines* pode ocorrer em temperaturas abaixo de 20° C ou acima de 30° C, porém em baixas proporções. Diogo *et al.* (1999) observaram tendência de redução na penetração em temperatura mínima de 17° C. Hambleton *et al.* (1972), relataram que em temperaturas abaixo de 14° C ou acima de 35° C a penetração de *H. glycines* foi completamente inibida.

A capacidade de penetração de J2 também pode variar de acordo com a raça do patógeno numa mesma faixa de temperatura. Desta forma, em temperatura variando entre 25 a 31° C, Gourdeau *et al.* (1993) verificaram que 44% dos J2 da raça 5 de *H. glycines* penetraram em cultivar suscetível contra 24% dos J2 da raça 1.



## 6 CONCLUSÕES

- 1) Maior penetração de J2 de *M. javanica* e de *H. glycines* ocorreu em areia fina.
- 2) Melhor temperatura para penetração de J2 de *M. javanica* nas cultivares testadas foi de 24° C, e para *H. glycines* foi de 21,3° C na cultivar suscetível e de 22,5° C na resistente.
- 3) A 12° C não ocorreu penetração de J2 de *M. javanica* em soja.
- 4) A 12° C quanto a 32° C ocorreu menor penetração de J2 de *H. glycines*.
- 5) A penetração de *M. javanica* e de *H. glycines* ocorreu em cultivares resistentes e suscetíveis, com a resistência manifestando-se após a penetração.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANWAR, S.A.; McKENRY, M.V. Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resistant *Vitis* spp. *Nematropica*, v.30, n.1, p.9-17, 2000.
- BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, v. 15, n.1, p. 142-143, 1983.
- DIAS, W.P. et al. Distribuição de raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA. **O nematóide de cisto da soja: a experiência brasileira**. Jaboticabal: Artsingner Editores, 1999. p. 95-103.
- DIOGO, A.M. et al. Penetração e reprodução de *Heterodera glycines*, raça 3, em algumas espécies vegetais. *Nematologia Brasileira*, Brasília, v.23, n.2, p.24-33, 1999.
- DI VITRO, M.; GRECO, N. Investigation on the biology of *Meloidogyne artiella*. *Revue de Nématologie*, v.11, n.2, p.223-227, 1988.
- ENDO, B.Y. Pathogenesis of nematode-infected plants. *Annual Review Phytopathology*, v. 13, p. 213- 238, 1975.
- GOODELL, P.B.; FERRIS, H. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, v.21, n.3, p.328-334, 1989.
- GOURD, T.R.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R. Penetration rates by second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. *Journal of Nematology*, Raleigh, v. 25, n. 1, p. 38-41, 1993.
- HAMBLEM, M.L.; SLACK, D.A.; RIGGS, R.D. Temperature effects on penetration and reproduction of soybean-cyst nematode. *Phytopathology*, v. 62, p. 762, 1972.
- HERMAN, M.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. *Journal of Nematology*, Lake Alfred, v. 23, n. 2, p. 155-161, 1991.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1128, 1973.

HUSSEY, R.S.; GRUNDLER, F.M.W. Nematode Parasitism of Plant. In: PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. New York: CABI, 1998. p.213-244.

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, p.373-380, 1988.

KOENNING, S.R.; WALTERS, S.A.; BARKER, K.R. Impact of soil texture on the reproductive and damage potentials of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* on cotton. **Journal of Nematology**, v. 28, n.4, p.527-536, 1996.

NIBLACK, T.L. The race concept. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St.Paul: APS, 1992. p. 73-86.

PEDROSA, E.M.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. Penetration and post-infectious development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* raça 1 and 2 on susceptible and resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 343-351, 1996.

PROT, J.C.; VAN GUNDY, S.D. Effect of soil texture and the clay component on migration of *Meloidogyne incognita* second-stage juvenil. **Journal of Nematology**, v.13, n.2, p. 213-217, Apr. 1981a.

PROT, J.C.; VAN GUNDY, S.D. Influence of photoperiod and temperatura on migration of *Meloidogyne* juvenil. **Journal of Nematology**, v.13, n. 2, p. 217-219, Apr. 1981b.

SCHMITT, R.D.; RIGGS, R.D. Population dynamic and management of *Heterodera glycines*. **Agricultural Zoology Reviews**, v.3, p. 253-269, 1989.

SCHMITT, R.D.; RIGGS, R.D. Influence of selected plant species on hatching of eggs and development of juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 23, n. 1, p. 1-6, 1991.

**TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. Biology, Identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina State University, 1978. 111p.**

**VAN GUNDY, S.D. Ecology of *Meloidogyne* spp.- emphases on enviromental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Raleigh: North Carolina. 1985. v.1, p.177-182.**

**WALLACE, H.R. Abiotic influences in the soil environment. In: ZUCKERMAN, B.M., MAI, W.F.; ROHDE, R.A. Plant parantic nematodes. New York: Academic, 1971. v.1, p. 257-280.**

### **CAPÍTULO 3**

**Penetração e migração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*.**

## 1 RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Penetração e migração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*. In: \_\_\_\_\_. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. 2003. Cap. 3. p. 49-71. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Observou-se acúmulo dos J2 de *M. javanica* na coifa e região de crescimento com predomínio de tecido meristemático, onde penetraram, seguido de migração entre os feixes pelas células parenquimatosas dos tecidos vasculares. Quantitativamente, nas primeiras 24 horas após a penetração, os J2 foram encontrados apenas na região de crescimento, decrescendo até 96 horas após, quando foram observados aquém desta região. A distância percorrida pelo J2 de *M. javanica* em 96 horas após a inoculação foi de 14,20 mm em relação à coifa e significativamente diferentes daquela às 24 horas. Entretanto, a penetração foi maior ( $P \leq 0,05$ ) 72 horas após a inoculação. Diferentemente de *M. javanica*, os J2 de *H. glycines* penetraram apenas pela região de alongamento e lateralmente na raiz movimentando-se para o cilindro central sem nenhum direcionamento para o meristema. Não foram observados J2 de *H. glycines* na região de crescimento da raiz. Maior penetração ocorreu com 24 horas. A incubação dos J2 em água por 4 dias ou mais diminuiu a penetração de *M. javanica* e de *H. glycines*, porém esse efeito foi mais drástico em *H. glycines*.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Penetration and migration of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines*. In: \_\_\_\_\_. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. Cap. 3. p. 49-71. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Crowding of J2 of *M. javanica* was observed at the root cap and growth region of the soybean root close to the meristem, where the J2 penetrated, followed by migration within the vessels through the parenchymatous cells. Quantitatively, at the first 24 hours after inoculation, the J2 were found, only, at the growth region of the root, decreasing since then, until 96 hours after, when they were observed away of this region. The distance travelled by the J2 of *M. javanica* in 96 hours after inoculation was 14,20 mm from that at 24 hours after. However, the penetration was greater ( $P = 0,05$ ) at 72 hours after inoculation. Unlike of *M. javanica*, the J2 of *H. glycines* penetrated only at elongation region of root and laterally, followed by movement toward central cylinder without any moving to the meristem. Any J2 of *H. glycines* was observed at the growth region of the root. Great penetration of *H. glycines* J2 occurred at 24 hours after inoculation. The incubation of J2 in water by 4 days or more, decreased the penetration of *M. javanica* and *H. glycines*, however, this effect was greater in *H. glycines*.

---

\* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

No processo de penetração, os juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* e de *Heterodera glycines* têm que se movimentar pelo solo em condições fisiológicas capazes de penetrar na raiz. Esta movimentação ocorre em resposta à atração pelo local de penetração na raiz (Endo, 1975; Young, 1992). Tem-se demonstrado o efeito de exsudato da raiz na atração do J2 (Klingler, 1965; Griffin & Waite, 1971; Zhao *et al.*, 2000). Entretanto, o J2 precisa manter 50% da sua energia corporal, basicamente sob a forma lipídica, para ter condições de penetrar no hospedeiro (Bergeson, 1959). O retardamento na penetração leva ao uso desta energia, principalmente em altas temperaturas, reduzindo a patogenicidade do J2 (Van Gundy *et al.*, 1967; Reversat, 1980). Contudo, esse processo precisa ser quantificado.

A penetração do J2 de *Meloidogyne* spp. e de *H. glycines* ocorre nas raízes novas especificamente na ponta da raiz. As regiões de crescimento e de alongamento têm sido descritas como os locais específicos para esta penetração (Wallace, 1973; Hussey & Williamson, 1998), entretanto, detalhes deste processo precisam de investigação. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, quantificar o processo de penetração e de migração nos tecidos internos e nas regiões da raiz por onde penetram os J2 de *M. javanica* e de *H. glycines*; estudar o efeito do tempo de incubação do J2 de *M. javanica* e de *H. glycines* em água na penetração em raízes de soja.



## MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines*

Os juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* e de *H. glycines* foram obtidos conforme descrito no capítulo 2, em 4.1.

### 4.2 Capacidade migratória de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* em raízes de soja após diferentes períodos da inoculação.

Sementes de soja da cultivar Embrapa-20 foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto e colocadas para germinar em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ . Após 3 dias da semeadura, as sementes germinadas com radícula de 2 cm foram transferidas para tubos de ensaio contendo  $30 \text{ cm}^3$  de areia fina quartizífera umedecida e previamente autoclavada a uma temperatura de  $120^\circ \text{C}$  por 20 minutos. Vinte quatro horas após, infestou-se a areia de cada tubo com 200 J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines*. Os tubos infestados foram colocados em câmara de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Após 24, 48, 72 e 96 horas da inoculação, as plântulas foram retiradas jorrando água nas paredes dos tubos. Os sistemas radiculares lavados foram submetidos ao clareamento dos tecidos em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 6 minutos, e enxaguados em água corrente para eliminar todo o resíduo de hipoclorito de sódio. Em seguida, foram transferidos para tubos de vidro onde foi adicionada uma solução corante diluída até cobrir as raízes, preparada com 3,5 gramas de fucsina ácida + 250 mL de ácido láctico + 750 mL de água

destilada (adaptado de Byrd *et al.*, 1983) e diluída 1: 29 (1 mL de solução corante inicial + 29 mL de água destilada). Em seguida, as raízes imersas no corante foram mantidas por 2 minutos em banho-maria com água em ebulição. O resfriamento total foi feito em condição ambiente durante a noite. As raízes foram, então, lavadas para eliminar o excesso de corante e recolocadas nos tubos. Cobriram-se todas as raízes com solução de glicerina 1:1 (100 mL de glicerina pura + 100 mL de água destilada) e estas foram deixadas em repouso por, no mínimo, duas horas. Em seguida, todas as raízes foram colocadas em lamina de vidro, adicionando-se sobre elas gotas de glicerina pura. Outra lâmina de vidro foi sobreposta a esta que, assim, estava pronta para observação no microscópio de objetiva invertida. Quantificou-se o número de J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines* penetrados no sistema radicular, o número de J2 na região de crescimento da raiz, o número de J2 após a região de crescimento e a distância média em milímetros percorrida pelo J2 a partir da coifa da raiz.

Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado, utilizando 4 períodos de avaliação após a inoculação para cada espécie de nematóide e 5 repetições. O número de J2 de *H. glycines* presente na região de crescimento da raiz foi transformado em raiz de  $x + 0,5$  para a realização da análise de variância.

#### **4.3 Efeito do tempo de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* na capacidade de penetração e na migração em raízes de soja.**

Tubos de ensaio contendo areia fina quartizífera e plântulas de soja da cultivar Embrapa 20 foram infestados com 100 J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines* incubados por zero, 4 ou 8 dias a 28° C, em água parada ou em borbulhamento. Em seguida, os tubos foram transferidos para câmaras com

temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Aos 4 e 12 dias após a inoculação, as plântulas foram retiradas, jorrando água nas bordas dos tubos, e os sistemas radiculares foram lavados. Em seguida, as raízes foram submetidas ao processo de clareamento dos tecidos e coloração dos juvenis, seguido da montagem em lâmina de vidro com glicerina.

Quantificou-se o número total de J2 de *M. javanica* e de *H. glycines* por sistema radicular e o número de J2 na região de crescimento da raiz, bem como o número daqueles que migraram além da região de crescimento da raiz e a distância por eles percorrida em milímetros.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com fatorial  $3 \times 2$ , com 3 períodos de incubação (zero, 4 e 8 dias) em água parada ou em borbulhamento e 6 repetições.

Nos dois ensaios utilizou-se o programa Sisvar para a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Capacidade migratória de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* em raízes de soja após diferentes períodos da inoculação.

Observou-se a penetração de J2 de *M. javanica* nas raízes de soja apenas na coifa, onde se concentravam, e na região de crescimento com predomínio de tecidos meristemático, seguida da migração entre os feixes pelas células parenquimatosas dos tecidos vasculares (Figura 1A e B). Na avaliação quantitativa da penetração o aumento de J2 dentro da raiz aumentou com o tempo decorrido da inoculação até as 72 horas, alcançando 42,8% daqueles inoculados (Figura 2), e foi maior do que aquele 24 horas após a inoculação, isto é, 20,4%. Vinte quatro horas após a inoculação, o total de J2 na raiz e na região de crescimento foram semelhantes. Entretanto, com o tempo decorrido da inoculação, o número de J2 na região de crescimento foi decrescendo, atingindo o nível mais baixo 96 horas após, o qual foi significativamente diferente daqueles às 24 horas da inoculação (Figura 2). Por outro lado, o número de J2 além da região de crescimento foi aumentando gradualmente até 72 horas e decresceu a partir de então, com incremento ou redução significativa em cada período avaliado (Figura 2). A distância do J2 em relação à coifa aumentou gradativamente em cada período avaliado, chegando a 14,20 mm da coifa às 96 horas e significativamente diferente daquele às 24 horas após a inoculação (Figura 2).

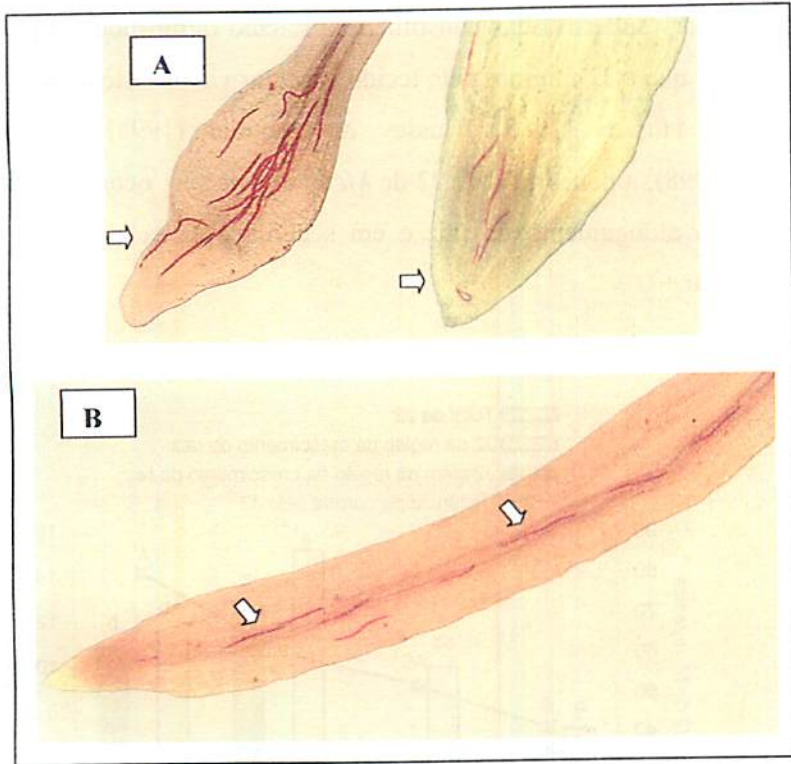


FIGURA 1- Penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*: A) pela coifa e meristema e concentração na coifa e B) migração ao longo do cilindro vascular.

O número de J2 na região de crescimento da raiz comprova quantitativamente que este é o local de penetração. Observou-se também aumento de J2 além da região de crescimento e significância comparativa entre as distâncias dos J2 às 96 horas e 24 horas após a inoculação, comprovando quantitativamente o movimento desse J2 aos tecidos vasculares. Esses resultados são semelhantes às observações com microcâmara feitas por Wyss *et al.* (1992) em *Arabidopsis thaliana* infectada por *Meloidogyne incognita*. De acordo com suas observações, os J2 são atraídos pela região de crescimento da raiz, invadem

as raízes pela zona de alongamento próxima ao meristema onde as paredes celulares são ainda finas. Os autores sugerem, ainda, que a endoderme com as estrias de Caspary suberificadas constituem obstáculo intransponível pelo J2, o que explica por que o J2 migram pelo tecido vascular via meristema da ponta da raiz. Segundo Hussey (1985), Hussey & Grundler (1998) e Hussey & Williamson (1998), a penetração de J2 de *Meloidogyne* spp. ocorre na região de crescimento ou alongamento da raiz e em seguida o J2 se direciona para o cilindro vascular.

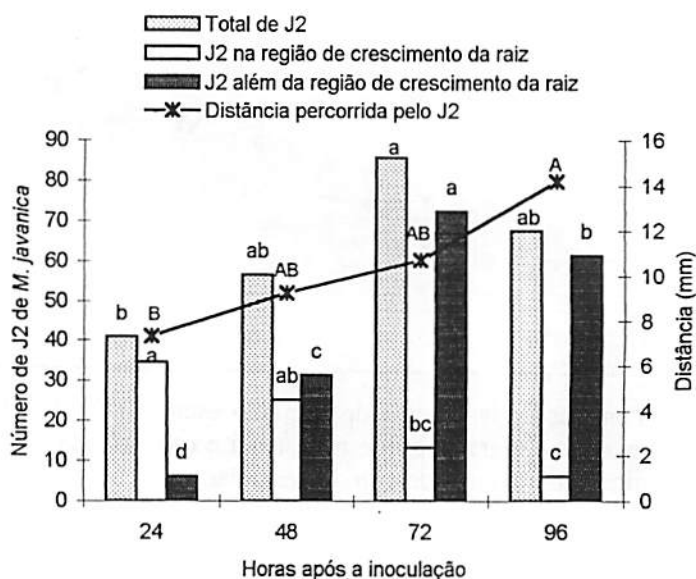


FIGURA 2- Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, J2 observados na região de crescimento e aqueles migrados além dessa região, distância percorrida pelo J2 a partir da coifa, após 24, 48, 72 e 96 horas da inoculação. Barras de mesma tonalidade e pontos da linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A redução de 9% no número de J2 dentro da raiz, no final desse ensaio, pode ser devido à emigração desse J2 para o solo, como observado por Herman *et al.* (1991) em cultivares resistentes de soja, cuja redução do número de J2 ocorreu a partir de 3 dias da inoculação e a taxa de emigração aos 5 dias variou de 54 a 72%.

No período de 16 dias, a maior penetração de J2 de *M. incognita* em soja foi observada por Herman *et al.* (1991) aos 4 dias após a inoculação. Gourd *et al.* (1993) encontraram maior penetração de J2 de *M. javanica* de 48 a 240 horas após a inoculação da soja.

A penetração de J2 de *H. glycines* ocorreu na região da raiz distante da meristemática. A movimentação do J2 foi basicamente lateral de forma intracelular até alcançar o cilindro central (Figura 3).

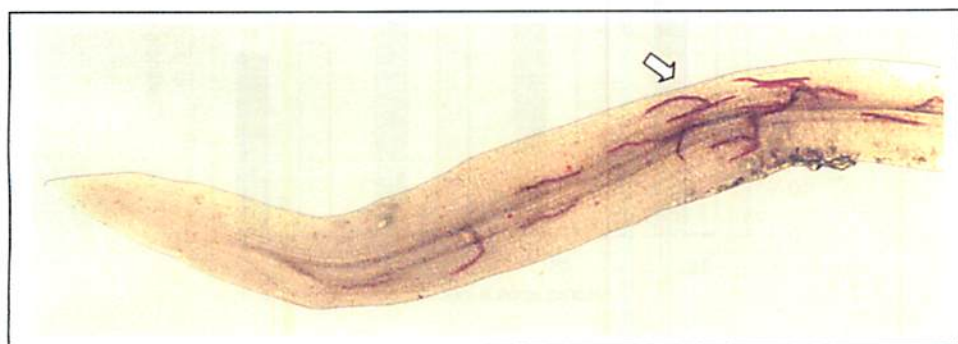


FIGURA 3- Penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*.

A análise quantitativa da penetração de J2 de *H. glycines* foi bem diferente de *M. javanica*. Contrastando com *M. javanica*, o número total de J2 e de J2 de *H. glycines* além da região de crescimento das raízes de soja foi elevado 24 horas após a inoculação, equivalendo a mais de 30% dos inoculados, e decresceram a partir de então até noventa e seis horas após a inoculação, quando

foram significativamente inferiores aos de 24 e 48 horas, isto é, menos que 20,5%.

Em qualquer período de tempo o número de J2 na região de crescimento da raiz foi aproximadamente nulo (Figura 4). A distância do J2 de *H. glycines* em relação a coifa caiu pronunciadamente entre os períodos de 24 e 48 horas e se manteve constante (20,02 mm da coifa) até 96 horas, entretanto estas diferenças não foram significativas (Figura 4).

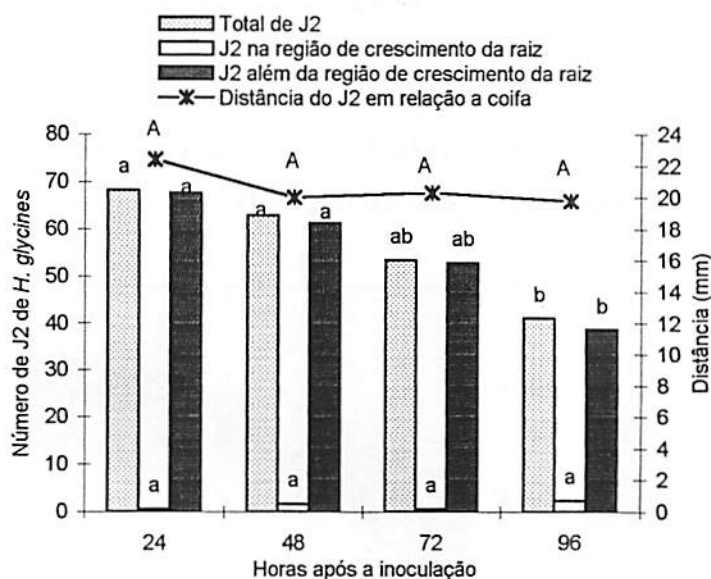


FIGURA 4- Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*, J2 observados na região de crescimento e aqueles além dessa região, distância do J2 a partir da coifa, após 24, 48, 72 e 96 horas da inoculação em raízes de soja. Barras de mesma tonalidade e pontos da linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



O número quase nulo de J2 na região de crescimento da raiz indica que esse nematóide penetra pela região de alongamento. Wyss & Zunke (1986) também encontraram resultados semelhante com *H. schachtii*. Hussey & Grundler (1998) constataram ruptura da parede epidermal da raiz na penetração de J2 de *H. glycines*, seguido da invasão dos tecidos e migração intracelular até alcançar o cilindro vascular.

O alto número de *H. glycines* nas raízes nas primeiras 24 horas da inoculação indica rápida movimentação do J2 em direção a raiz ou mesmo ótima eficácia do fator atrativo da raiz. Gourde *et al.* (1993) também encontraram rápida penetração de J2 de *H. glycines* até 48 horas da inoculação em soja.

A distância igual percorrida pelo J2 de *H. glycines* em cada período de tempo indica que ocorreu pouca movimentação interna desse J2, já que ele rompe as camadas de células laterais da raiz (Hussey & Grundler, 1998), não precisando se movimentar para o meristema para obter a via de movimentação dentro do cilindro central, como faz *M. javanica* (Grunder & Wyss, 1995).

## **5.2 Influência do tempo de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* na capacidade de penetração e na migração em raízes de soja.**

O número total de J2 de *M. javanica* na raiz de soja a partir de inóculo incubado em água por 4 dias foi semelhante ( $P \leq 0,05$ ) aquele sem incubação, decrescendo significativamente quando o inóculo foi incubado por 8 dias. Maior ( $P \leq 0,05$ ) número de J2 na região de crescimento da raiz ocorreu quando o inóculo foi incubado por 4 dias (Figura 5). Contudo, o aumento do período de incubação do J2 reduziu significativamente, em qualquer período, o número de J2 além da região de crescimento da raiz, mas a distância percorrida pelo J2 não diferiu com o período de incubação (Figura 5). Entretanto, quando se comparam

as avaliações feitas aos 4 e 12 dias após a inoculação, o número total de J2 e a distância percorrida 12 dias após a inoculação foram maiores do que aos 4 dias. Contudo, o número de J2 aos 12 dias diminuiu na região de crescimento e aumentou além da região de crescimento comparado aos 4 dias (Tabela 1).

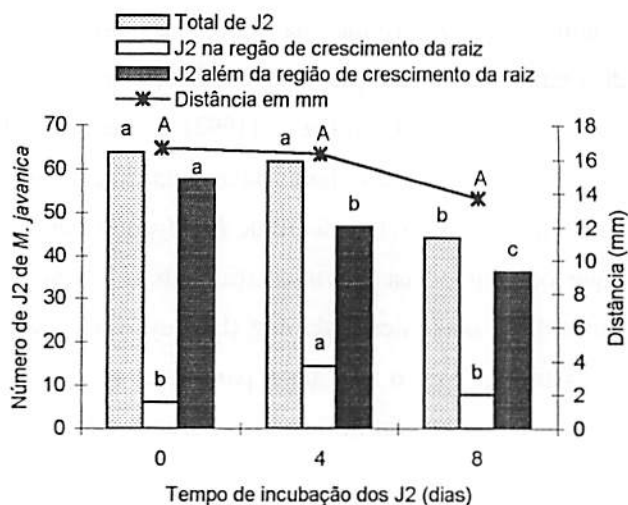


FIGURA 5- Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, J2 observados na região de crescimento da raiz, J2 migrados a partir dessa região e distância percorrida pelo J2 a partir da coifa, após os J2 serem incubados em água por zero, 4 e 8 dias antes da inoculação. Barras de mesma tonalidade e pontos na linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O efeito da incubação dos J2 em água parada ou em borbulhamento não foi significativo ( $P \leq 0,05$ ) para *M. javanica* ou para *H. glycines* (Figura 6), porém com maior penetração de J2 de *M. javanica*.

TABELA 1- Efeito do período de incubação em água dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na capacidade de penetração e migração em raiz de soja aos 4 e 12 dias após a inoculação: J2 na região de crescimento da raiz (J2 RC); J2 migrados além da região de crescimento (J2 MIG); total de J2 e distância percorrida pelo J2 na raiz em milímetros (D J2).

Período de incubação dos J2 (dias)	Tempo de avaliação após a inoculação dos J2 (dias)							
	4				12			
	Total J2	J2 RC	J2 MIG	D J2	Total J2	J2 RC	J2 MIG	D J2
0	55,83 a	8,67 c	47,50 a	10,01 a	71,58 a	3,67 a	67,92 a	23,32 a
4	58,17 a	24,17 a	33,17 b	12,98 a	65,42 a	5,00 a	60,42 a	19,64 a b
8	41,33 b	13,17 b	28,17 b	11,09 a	46,92 b	2,58 a	44,33 b	16,34 b
CV %	19,97	39,70	23,33	36,06	19,97	39,70	23,33	36,06

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

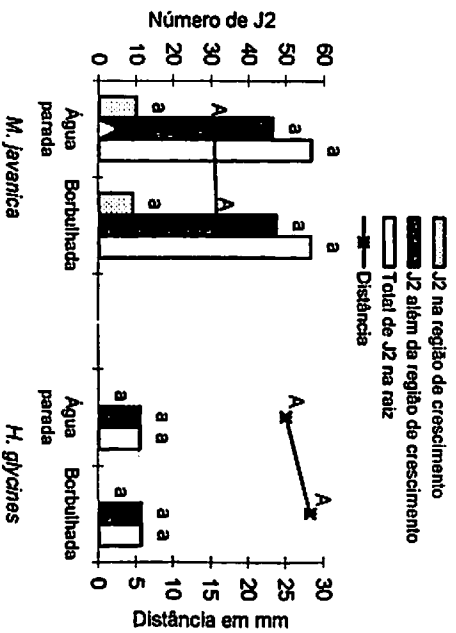


FIGURA 6- Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines*, J2 observados na região de crescimento da raiz e aqueles além dessa região, distância percorrida pelo J2 a partir da coifa após a inoculação em soja de J2 incubados em água parada ou em borbulhamento. Barras de mesma tonalidade e pontos da linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para *H. glycines* a incubação, tanto por 4 quanto por 8 dias, reduziu drasticamente ( $P \leq 0,05$ ) o número de J2 dentro da raiz e a distância percorrida por eles (Figura 6). O número de J2 na região de crescimento foi zero tanto na avaliação aos 4 dias quanto aos 12 dias (Figura 7 e Tabela 2). Nas avaliações aos 4 e 12 dias, o número total e de J2 além da região de crescimento foram mais baixos ( $P \leq 0,05$ ) em qualquer período de incubação comparados com aqueles recentemente eclodidos (Tabela 2).

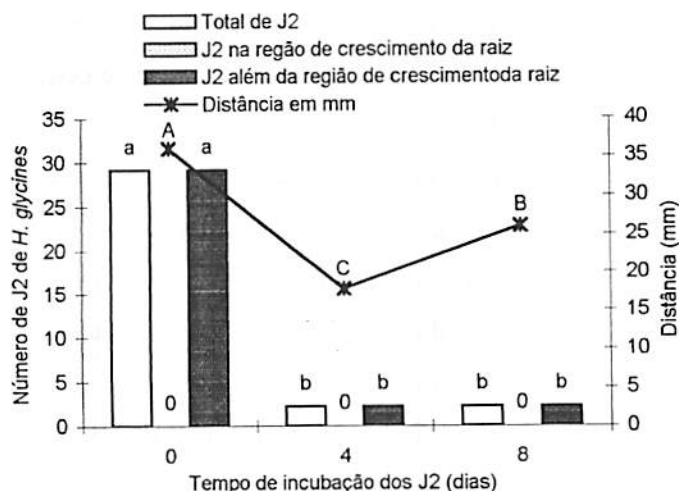



FIGURA 7. Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*, J2 observados na região de crescimento da raiz, J2 após essa região e distância do J2 nos tecidos da raiz a partir da coifa, após os J2 serem submetidos ao envelhecimento em água por zero, 4 e 8 dias antes da inoculação. Barras de mesma tonalidade e pontos na linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os J2 de *M. javanica* incubados por 4 dias (Figura 5) já manifestaram prováveis efeitos deletérios da privação alimentar, pois um número significativo de J2 permaneceu na região de crescimento, indicando, talvez, dificuldade de migração devido à carência da reserva lipídica corporal. Contudo, nesse período o número total dentro da raiz não se diferenciou daqueles J2 recentemente eclodidos (Figura 5). Esse efeito deletério foi mais drástico ao J2 no período de 8 dias de incubação.

Dutra (2002) encontrou redução significativa no número de galhas por sistema radicular de alface a partir de 2 dias de incubação dos J2 de *M. incognita*



em água. Thomason *et al.* (1964), trabalhando com *M. javanica* em tomate, encontraram redução na infectividade do J2 a partir do 4<sup>o</sup> dia de incubação em água. Reversat (1981) incubou J2 de *M. javanica* por 5 semanas em meio líquido e encontrou redução total da mobilidade e infectividade e perda de 60% da sua reserva corporal desses J2.

A distância percorrida pelo J2 de *H. glycines* dentro da raiz, após a incubação por qualquer período, não se diferenciou ( $P \leq 0,05$ ) daquele recentemente eclodido. Contudo, foi menor ( $P \leq 0,05$ ) em qualquer período de incubação dos J2 quando avaliados aos 12 dias após a inoculação (Tabela 2).

A incubação foi mais detrimental para os J2 de *H. glycines* do que para os de *M. javanica*, talvez devido à perda mais rápida da reserva corporal pelo *H. glycines*. Outro reflexo dessa perda de reserva corporal pode estar expressa na menor distância percorrida pelo J2 a partir do 4<sup>o</sup> dia de incubação (Tabela 2). Reversat (1980), incubou *Heterodera oryzae* em meio líquido por 5 semanas e em seguida os inoculou em raízes de arroz. A penetração foi de apenas 1,6%, comparado com 52% dos J2 recentemente eclodidos. No entanto, Storey (1984) encontrou menor infectividade de *Globodera rostochiensis* em plântulas de tomate a partir de 15 dias da incubação de J2 em água.

TABELA 2- Efeito do período de incubação dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines* na capacidade de penetração e migração em raiz de soja aos 4 e 12 dias após a inoculação: total de J2 penetrados na raiz, J2 na região de crescimento da raiz (J2 RC), J2 observados além da região de crescimento (J2 ARC) e distância do J2 na raiz a partir da coifa, em milímetros (D J2).

Período de incubação dos J2 (dias)	Tempo de avaliação após a inoculação dos J2 (dias)							
	4				12			
	Total J2	J2 RC	J2 ARC	D J2	Total J2	J2 RC	J2 ARC	D J2
0	21,83 a	0	21,83 a	24,10 a	36,50 a	0	36,50 a	48,05 a
4	2,42 b	0	2,42 b	21,82 a	2,08 b	0	2,08 b	13,75 c
8	2,67 b	0	2,67 b	24,86 a	1,83 b	0	1,83 b	27,18 b
CV %	43,14	0	43,14	28,83	43,14	0	43,14	28,83

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

HUSSEY, R.S.; GRUNDLER, F.M.W. Nematode parasitism of plant. In: PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. New York: CABI, 1998. p.213-244.

HUSSEY, R.S.; WILLIAMSON, V.M. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. **Plant and nematode interactions**. Hardcover: American Society of Agronomy, 1998. p.87-108.

KLINGLER, J. On the orientation of plant nematodes and of some other soil animals. **Nematologica**, Leiden, v. 11, n. 1, p. 4-18, 1965.

REVERSAT, G. Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions inducing osmobiogenesis. **Nematologica**, v.27, p. 207-214, 1981.

REVERSAT, G. Effect of vitro storage time on the physiology of second stage juveniles of *Heterodera oryzae*. **Revue Nématologie**, v.3, n.2, p. 233-241, 1980.

STOREY, R.M.J. The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* spp. **Annual Applied Biology**, v. 104, p. 511-520, 1984.

THOMASON, D.A.; VAN GUNDY, S.D.; KIRKPATRICK, J.D. Motility and infectivity of *Meloidogyne javanica* as affected by storage time and temperature in water. **Phytopathology**, v. 54, p. 192-195, 1964.

VAN GUNDY, S.D.; BIRD, A.F.; WALLACE, H.R. Ageing and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, v.57, p. 559-571, 1967.

WALLACE, H.R. **Nematode ecology and plant disease**. New York: Crane, Russak & Company, 1973. 228 p.

WYSS, U.; GRUNDLER, F.M.W.; MÜNCH, A. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Nematologica**, v. 38, p. 98, 1992.

WYSS, U.; ZUNKE, U. Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. **Revue Nématologie**, v. 9, n.2, p. 153-165, 1986.



TABELA 2- Efeito do período de incubação dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines* na capacidade de penetração e migração em raiz de soja aos 4 e 12 dias após a inoculação: total de J2 penetrados na raiz, J2 na região de crescimento da raiz (J2 RC), J2 observados além da região de crescimento (J2 ARC) e distância do J2 na raiz a partir da coifa, em milímetros (D J2).

Período de incubação dos J2 (dias)	Tempo de avaliação após a inoculação dos J2 (dias)							
	4				12			
	Total J2	J2 RC	J2 ARC	D J2	Total J2	J2 RC	J2 ARC	D J2
0	21,83 a	0	21,83 a	24,10 a	36,50 a	0	36,50 a	48,05 a
4	2,42 b	0	2,42 b	21,82 a	2,08 b	0	2,08 b	13,75 c
8	2,67 b	0	2,67 b	24,86 a	1,83 b	0	1,83 b	27,18 b
CV %	43,14	0	43,14	28,83	43,14	0	43,14	28,83

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) A penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines* foi mais elevada 24 horas após a inoculação, enquanto para *Meloidogyne javanica*, ocorreu 72 horas após.
- 2) J2 de *M. javanica* penetrou pela coifa e região de crescimento, porém *H. glycines* penetrou pela região de alongamento.
- 3) A incubação em água por 4 dias ou mais diminuiu a penetração de J2 de *M. javanica* e de *H. glycines*, porém foi mais drástica em *H. glycines*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGESON, G.B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. *Nematologica*, v. 4, p. 344-354, 1959.

BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, v. 15, n.1, p. 142-143, 1983.

DUTRA, M.R. Manejo do solo e da água no controle de nematóides de galhas (*Meloidogyne* sp.) e estudos "in vitro" da temperatura e umidade na infectividade desses patógenos. 2002. 131p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ENDO, B.Y. Pathogenesis of nematode-infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 13, p. 213-238, 1975.

GOURD, T.R.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R. Penetration rates by second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. *Journal of Nematology*, Raleigh, v. 25, n. 1, p. 38-41, 1993.

GRIFFIN, G.D.; WAITE, W.W. Attraction of *Ditylenchus dipsaci* and *Meloidogyne hapla* by resistant and susceptible alfalfa seedlings. *Journal of Nematology*, v. 3, n. 3, p. 215-219, 1971.

GRUNDLER, F.M.W.; WYSS, U. Strategies of root parasitism by sedentary plant parasitic nematodes. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U.S.; SINGH, R.P. *Pathogenesis and host specificity in plant diseases*. Oxford: Elsevier Science, 1995. v.2. p. 309-319.

HERMAN, M.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. *Journal of Nematology*, Lake Alfred, v. 23, n. 2, p. 155-161, 1991.

HUSSEY, R.S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. *An advanced treatise on Meloidogyne: Biology and Control*. 1985. v. 1, p. 422-455.

HUSSEY, R.S.; GRUNDLER, F.M.W. Nematode parasitism of plant. In: PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. New York: CABI, 1998. p.213-244.

HUSSEY, R.S.; WILLIAMSON, V.M. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. **Plant and nematode interactions**. Hardcover: American Society of Agronomy, 1998. p.87-108.

KLINGLER, J. On the orientation of plant nematodes and of some other soil animals. *Nematologica*, Leiden, v. 11, n. 1, p. 4-18, 1965.

REVERSAT, G. Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions inducing osmobirosis. *Nematologica*, v.27, p. 207-214, 1981.

REVERSAT, G. Effect of vitro storage time on the physiology of second stage juveniles of *Heterodera oryzae*. *Revue Nématologie*, v.3, n.2, p. 233-241, 1980.

STOREY, R.M.J. The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* spp. *Annual Applied Biology*, v. 104, p. 511-520, 1984.

THOMASON, D.A.; VAN GUNDY, S.D.; KIRKPATRICK, J.D. Motility and infectivity of *Meloidogyne javanica* as affected by storage time and temperature in water. *Phytopathology*, v. 54, p. 192-195, 1964.

VAN GUNDY, S.D.; BIRD, A.F.; WALLACE, H.R. Ageing and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology*, v.57, p. 559-571, 1967.

WALLACE, H.R. **Nematode ecology and plant disease**. New York: Crane, Russak & Company, 1973. 228 p.

WYSS, U.; GRUNDLER, F.M.W.; MÜNCH, A. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*, v. 38, p. 98, 1992.

WYSS, U.; ZUNKE, U. Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue Nématologie*, v. 9, n.2, p. 153-165, 1986.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C.M. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1239-1245, 2000.

YOUNG, L.D. Epiphytology and life cycle. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St.Paul: APS, 1992. p. 27-36.

## **CAPÍTULO 4**

**Estudos de inóculo, inoculação e de extração do nematóide de galhas  
(*Meloidogyne javanica*)**

## 1 RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Estudos de inóculo, inoculação e de extração do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*). In: \_\_\_\_\_. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. 2003. Cap. 4. p. 72-94. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar: a) o efeito da inoculação fora ou na rizosfera de tomateiro na reprodução de *Meloidogyne javanica*; b) a eficiência de diferentes metodologias de extração de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica*; e c) os processos de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário e formação dos juvenis na população de ovos no início do processo reprodutivo da fêmea de *M. javanica*. A maior reprodução de *M. javanica* em tomateiro ocorreu quando a inoculação foi realizada na rizosfera da planta. Mas a inoculação fora da rizosfera, delimitada pela moldura de gesso, pode facilitar estudos de exaustão da reserva corporal do J2. Os métodos por centrifugação em sacarose (MCS), de Jenkins (1964) modificado (MJM) e de decantação em água (MDA) foram mais eficientes na recuperação de J2 de *M. javanica*. A fêmea de *M. javanica* desenvolvida em tomateiro a  $27 \pm 2^\circ$  C iniciou a postura 20 dias após a inoculação do J2, com ovos apenas na fase de multiplicação celular. A maior população de ovos ocorreu aos 26 e 28 dias após a inoculação dos J2. Aos 22 dias após a inoculação predominou o estágio pluricelular dentro dos ovos. Aos 24 e 26 dias já ocorreu aumento significativo nos estádios de desenvolvimento embrionário e de juvenil formado. Aos 28 dias predominou o estágio de gástrula e de juvenil formado, com apenas 38,39% dos ovos no estágio de multiplicação celular, podendo ser caracterizado como bom inóculo para pesquisa.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Studies on inoculum, inoculation and extraction of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*). In: \_\_\_\_\_. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. Cap. 4. p. 66-85. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

This work aimed to evaluate: a) the effect of inoculation in and away of the rhizosphere plant of tomato on reproduction of *Meloidogyne javanica*, b) the efficiency of different extraction methodologies of second stage juveniles (J2) of *M. javanica* and c) the processes of cellular multiplication, embryonic development and formation of juveniles in egg populations at the beginning of reproductive process of female of *M. javanica*. Greater reproduction of *M. javanica* in tomato occurred when inoculation was done in the plant rhizosphere. But the inoculation away of that delimited by form made of gypsum at the size of seedling cell of germinating box, may facilitate studies on exhaustion of body reserve of energy of J2. The methods of centrifugation on sucrose (MCS), modified Jenkins (1964) (MJM) and decantation in water (MDA) were better on recovering of J2 of *M. javanica*. The female of *M. javanica* developed in tomato at  $27 \pm 2^\circ$  C initiated the egg laying 20 days after J2 inoculation, with eggs only on cellular multiplication phase. Great egg production occurred 26 to 28 days after inoculation of the J2. At the 24 to 26 days periods occurred greater ( $P \leq 0,05$ ) increase in embryonic development stage and formed juveniles in the eggs. At 28 days occurred, predominately, the gastrula stage and formed juveniles in the eggs, with only 38,39% of the eggs at the cellular multiplication phases, which can be characterized as a good inoculum for research.

---

\* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.



### 3 INTRODUÇÃO

O êxito na investigação científica está ligado a escolha adequada da metodologia. Muitas vezes é necessário criar nova metodologia para estudar determinado fenômeno biológico. Dutra (2002) utilizou moldura de gesso no formato de uma muda para delimitar o local da inoculação de nematóide após a incubação do inóculo em água que resultava em privação alimentar. Nos seus estudos, a inoculação foi realizada fora da rizosfera obrigando o juvenil a se movimentar para encontrar a raiz. Aqueles com reserva exaurida não infectavam a planta. Entretanto, na maioria das pesquisas inocula-se o nematóide dentro da rizosfera. Desta forma, é necessário comparar tais metodologias e aprofundar-se na adequação do seu uso.

Observa-se também na literatura científica o emprego de diversos métodos de extração de fitonematóides (Sharma *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003). Visando separar formas livres de nematóides do solo, Campos (1987); Almeida & Campos (1993); Carneiro *et al.* (1998) têm empregado o método de Jenkins (1964) principalmente quando fazem estudos de levantamento de fitonematóides em diferentes regiões. Entretanto, ainda não se aprofundaram na eficácia desses métodos na extração de espécimes do solo.

Sabe-se que dentro do ovo ocorrem os processos de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário e formação dos juvenis do primeiro e segundo estádios (Lee & Atkinson, 1977; Campos *et al.*, 2001). A evolução desses processos em diferentes ambientes, inclusive no campo, tem sido estudada por vários autores (Davide & Triantaphyllou, 1967; Bird, 1972; Wallace, 1971; Prot & Van Gundy, 1981; Decker, 1989; Alves & Campos, 2001; Dutra, 2002), mas ainda é preciso entender esses processos na fase de produção de inóculo para as pesquisas. Desta forma, objetivou-se, neste

trabalho: a) estudar o efeito da inoculação fora ou na rizosfera na reprodução de *Meloidogyne javanica*; b) estudar a eficiência de diferentes metodologias de extração de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica*; e c) avaliar os processos de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário e formação dos juvenis na população de ovos no início do processo reprodutivo da fêmea de *M. javanica*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica*.

Os juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* foram obtidos conforme descrito no capítulo 2, em 4.1.

### 4.2 Estudos sobre local de inoculação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em plantas de tomateiro.

Para estabelecer os locais de inoculação de J2 de *M. javanica*, utilizou-se uma moldura de gesso com formato, volume e área correspondente a uma célula da bandeja de isopor (Dutra, 2002), a qual foi introduzida em copos plásticos de 300 mL de capacidade, com mistura de solo e areia grossa (2:1) desinfestada com brometo de metila na dosagem de  $150 \text{ cm}^3/\text{m}^3$  do substrato, previamente umedecida. Esta forma era substituída, posteriormente, por uma muda de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cultivar Kada, do grupo Santa Cruz) após a inoculação de *M. javanica*. Em outros copos contendo o mesmo substrato, porém sem a moldura de gesso, também foram transplantadas mudas de tomate. Em seguida, o substrato de cada recipiente foi infestado com uma suspensão de 5 mL, contendo 100 J2 por mL, através de quatro orifícios de 1,5 cm de profundidade nos tratamentos: fora da rizosfera e sem a moldura de gesso, porém com a muda de tomateiro presente (I); fora da área da rizosfera e tendo esse espaço ocupado pela moldura de gesso, seguido do transplântio da muda de tomateiro (II) e introdução do inóculo dentro da rizosfera da muda de tomateiro (III). As plantas inoculadas foram mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ \text{ C}$ , com 14 horas luz e 10 horas escuro.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com três locais de inoculação e 5 repetições.

Ao vinte dias após a inoculação as plantas foram removidas dos copos. Os sistemas radiculares foram lavados e separados da parte aérea. A seguir, foram submetidos ao clareamento dos tecidos em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 10 minutos, e lavados em água corrente para eliminar todo o resíduo de hipoclorito de sódio. As raízes foram transferidas para tubos de vidro onde foi adicionada uma solução corante diluída até cobri-las. Para preparar esta solução utilizaram-se 3,5 gramas de fucsina ácida + 250 mL de ácido láctico + 750 mL de água destilada (adaptado de Byrd *et al.*, 1983). Na diluição utilizaram-se 29 mL de água destilada para cada 1mL da solução inicial. As raízes foram, então, imersas no corante e aquecidas por 2 minutos em banho-maria após a água ter atingido o ponto de ebulição. Após o resfriamento total em condições de ambiente durante a noite, as raízes foram lavadas para eliminar o excesso de corante, retornadas aos tubos e cobertas por solução de glicerina 1: 1 (glicerina pura + água destilada) e mantidas por no mínimo duas horas. Em seguida, todo o sistema radicular foi montado em lâmina de vidro com glicerina pura sobrepondo outra lâmina de vidro. Quantificou-se, então, o número de J2 e J3 a adulto por sistema radicular.

Aos 30 dias após a inoculação as plantas foram retiradas dos copos com auxílio de jato de água. Os sistemas radiculares foram lavados e pesados. Em seguida, utilizou-se a técnica de Hussey & Barker (1973) para a extração dos ovos. Em microscópio de objetiva invertida estimou-se o número de ovos de *M. javanica* por sistema radicular e por grama de raiz.

### **4.3 Avaliação de métodos de extração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em diferentes substratos.**

Foram testadas cinco metodologias de extração. Para cada uma utilizaram-se 50 cm<sup>3</sup> de substrato areia fina quartizifera ou mistura de solo e areia grossa (2: 1), contidos em becker de 100 mL, previamente umedecido e infestado com 1 mL de uma suspensão contendo 500 J2 de *M. javanica*. Do mesmo substrato fizeram-se três extrações.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado em fatorial 2 x 5 (2 substrato e 5 métodos de extração) e 5 repetições.

Os métodos empregados foram:

1) **Método de Jenkins (MJ)** – cinquenta cm<sup>3</sup> do substrato infestado com J2 foram colocados em um becker de 1 litro e procedeu-se a extração conforme Jenkins (1964). Na suspensão coletada foi quantificado o número de J2 recuperados através de microscópio de objetiva invertida.

2) **Método de centrifugação em sacarose (MCS)** - em becker de 1 litro colocaram-se 50 cm<sup>3</sup> do substrato e completou-se o volume para 600 mL. Agitou-se por 20 segundos, e a suspensão foi vertida em conjunto de peneiras de 0,25 mm sobre a peneira de 0,025 mm. O material (substrato + nematóide) retido na peneira de 0,025 mm foi recolhido com sacarose (454g de açúcar por litro de água) e distribuídos em tubos de centrifuga com capacidade de 50 mL cada. Centrifugou-se a 1700 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi vertido em peneira de 0,025 mm e os J2 foram enxaguados com água e recolhidos na caixa de contagem. Quantificou-se o número de J2 recuperados através de microscópio de objetiva invertida.

3) **Método de decantação em sacarose (MDS)** - em recipiente de vidro com 15 cm de altura e 4 cm de diâmetro, com capacidade para 200 mL, colocaram-se 50 cm<sup>3</sup> de substrato infestado com J2 e completou-se o volume

para 150 mL com sacarose (454 g de açúcar por litro de água). Agitou-se manualmente por 20 segundos, seguido de repouso por 5 minutos. Em seguida, a sacarose em sobrenadante foi vertida em um conjunto de peneiras de 0,075, sobre 0,025 mm, e lavada em água corrente. Na suspensão coletada foi quantificado o número de J2 recuperados através de microscópio de objetiva invertida.

4) **Método de decantação em água (MDA)** - em recipiente de vidro com 15 cm de altura e 4 cm de diâmetro, com capacidade para 200 mL, colocaram-se 50 cm<sup>3</sup> de substrato infestado com J2 e completou-se o volume para 150 mL com água de torneira. Agitou-se manualmente por 20 segundos, seguido de repouso por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em um conjunto de peneiras de 0,075, sobre 0,025, mm e lavado em água corrente. Na suspensão coletada foi quantificado o número de J2 recuperados através de microscópio de objetiva invertida.

5) **Método de Jenkins modificado (MJM)** – colocaram-se 50 cm<sup>3</sup> do substrato infestado com J2 em um becker de 1 litro e completou-se o volume para 900 mL com água de torneira. Agitou-se por 1 minuto e verteu-se em um conjunto de peneira de 0,25, sobre a de 0,025 mm. O material retido na peneira de 0,025 mm foi recolhido em tubos de centrifuga com capacidade para 50 mL e centrifugados a 2000 rpm por 20 segundos. O sobrenadante foi vertido em peneira de 0,025 mm, obtendo-se uma alíquota contendo J2. O precipitado foi resuspenso em sacarose (454 g de açúcar por litro de água) e centrifugados a 2000 rpm por 20 segundos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em peneira de 0,025 mm e os J2 foram enxaguados em água corrente. Os J2 foram recolhidos em caixa de contagem juntamente com aqueles extraídos do sobrenadante. Com o auxílio de microscópio de objetiva invertida, quantificou-se o número de J2 recuperados no substrato.

#### **4.4 Reprodução e quantificação dos ovos em processos de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário e formação do juvenil de *Meloidogyne javanica* em diferentes períodos de tempo após a inoculação de tomateiro.**

Uma moldura de gesso com volume correspondente a uma célula da bandeja de isopor para produção de mudas (Dutra, 2002), foi introduzida em copo plástico de 300 mL de capacidade, contendo mistura de solo e areia grossa (2:1) desinfestada com brometo de metila na dosagem de 150 cm<sup>3</sup>/m<sup>3</sup> do substrato, previamente umedecida. A moldura foi substituída, posteriormente, por uma muda de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cultivar Kada, do grupo Santa Cruz). Em seguida, o substrato foi infestado com uma suspensão de 5 mL, contendo 100 J2 por mL, através de quatro orifícios de 1,5 cm de profundidade paralelos à rizosfera da planta. Após 4 dias da inoculação, as plantas foram removidas cuidadosamente dos copos e transplantadas para outros copos contendo o mesmo tipo de substrato desinfestado. Essas plantas foram mantidas em sala climatizada a 27 ± 2° C com 14 horas luz e 10 horas escuro.

Aos 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 dias após a inoculação, as plantas foram removidas cuidadosamente dos vasos e os sistemas radiculares separados da parte aérea e lavados. Em seguida, os ovos foram extraídos utilizando-se a técnica descrita por Hussey & Barker (1973). Em microscópio de objetiva invertida quantificaram-se o número de ovos por sistema radicular (total), número de ovos por grama de raiz e estimaram-se o percentual de ovos em processos de multiplicação celular e os estádios de desenvolvimento embrionário e juvenil formado, conforme descrito por Bird (1972), de acordo com o tempo de incubação das plantas infestadas por *M. javanica*.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 10 épocas de avaliação, em 8 repetições.

Na análise de variância utilizou-se o programa Sisvar. Apenas os dados de ovos totais, percentual de ovos sem divisão celular, ovos com 4 células, estágio de gástrula e juvenil dentro do ovo foram transformados para raiz de  $X + 0,5$ . As médias em todos os ensaios foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito dos locais de inoculação de juvenis do segundo estágio (J2) na reprodução de *Meloidogyne javanica* em plantas de tomateiro.

Na avaliação aos 20 dias após a inoculação, maior ( $P \leq 0,05$ ) número de J2 de *M. javanica* ocorreu nas raízes de tomateiro em que a inoculação foi feita fora da rizosfera, porém sem a moldura de gesso. Contudo a população de J3, J4 e adultos foi maior ( $P \leq 0,05$ ) tanto nas plantas em que se inocularam J2 fora da rizosfera sem a moldura de gesso como dentro da rizosfera (Tabela 1). A reprodução de *M. javanica* avaliada aos 30 dias após a inoculação foi maior quando a inoculação dos J2 foi feita dentro da rizosfera da muda de tomate (Tabela 1).

O número igual ( $P \leq 0,05$ ) de J3, J4 e adultos resultantes da inoculação, tanto fora da rizosfera e sem moldura de gesso (I) como dentro da rizosfera (III), demonstra que nas condições do ensaio a distância para se chegar ao local de penetração não constituiu obstáculo para o processo de penetração. Entretanto, os J2 inoculados na rizosfera tiveram maior capacidade reprodutiva, provavelmente pela maior capacidade individual de cada J2 penetrado devido à economia da reserva energética corporal pela pouca movimentação em direção a raiz e pela facilidade do reconhecimento do local de penetração devido à abundância de substâncias atrativas na rizosfera.

Por outro lado, a forma de gesso colocada antes da inoculação constituiu em obstáculo maior à penetração. Desta forma, a inoculação fora da rizosfera poderá ser importante metodologia para avaliar condições que levam à exaustão da sua energia corporal. Também esta condição pode prevalecer em áreas em que as raízes infestadas foram eliminadas e, assim, a semeadura de nova cultura

precisará formar sua rizosfera e atrair os J2 das circunvizinhanças.

TABELA 1- Reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro expressa em total de juvenis do segundo estágio (J2) por sistema radicular, número de juvenis do terceiro e quarto estágios (J3 e J4), adultos e ovos por sistema radicular e número de ovos por grama de raiz, a partir de diferentes locais de inoculação de J2 como fora da rizosfera e sem a moldura de gesso, porém com a muda de tomateiro presente (I); fora da área da rizosfera e tendo esse espaço ocupado por uma moldura de gesso, seguido do transplântio da muda de tomateiro (II) e introdução do inóculo dentro da rizosfera da muda de tomateiro (III).

Forma de inoculação	20 dias após a inoculação		30 dias após a inoculação	
	Nº de J2	Nº de J3, J4 e adultos	Ovos / sistema radicular	Ovos / g de raiz
I	7,40 a	116,20 a	15.438,00 b	10.031,63 b
II	3,20 b	62,60 b	10.069,60 b	9.825,71 b
III	2,20 b	132,60 a	22.253,60 a	23.923,80 a
CV %	29,34	14,44	20,32	17,47

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dutra (2002), utilizando a moldura de gesso, verificou que a privação alimentar de J2 por 2 dias em solo úmido a 28° C causou perda da capacidade infectiva e reprodutiva de *M. incognita*, reduzindo em 40% o número de galhas em tomateiro. A colocação dos J2 a 1 cm do local da muda obrigou-os a se movimentarem em direção às raízes, reduzindo as suas reservas energéticas corporais e, conseqüentemente, afetando a infectividade. Sob condições de umidade adequada no solo para migração, os J2 de *Meloidogyne* perdem gradualmente a sua habilidade de encontrar e infectar o seu hospedeiro (Goodel

& Ferris, 1989). Os autores sugerem que a atividade muscular durante a migração requer grande utilização das reservas corporais. Portanto, a técnica da moldura de gesso torna mais eficaz a avaliação da perda desta reserva através de bioteste com planta suscetível.

## **5.2 Avaliação de métodos de extração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em diferentes substratos.**

A recuperação de J2 de *M. javanica* foi semelhante nos dois substratos testados, areia fina e mistura de solo + areia grossa. Entre os métodos, a recuperação de J2 foi maior ( $P \leq 0,05$ ) pelos métodos de centrifugação em sacarose (MCS), de Jenkins modificado (MJM) e de decantação em água (MDA), com 20,56, 21,04 e 17,12 % de recuperação em areia fina, respectivamente, e 21,40, 17,92 e 17,64 % em solo + areia grossa, respectivamente (Figura, 1). Na segunda extração, os métodos MCS, MJM e MDA foram também melhores ( $P \leq 0,05$ ). Porém extraíram apenas 14,07, 20,36 e 17,51%, respectivamente, em relação à primeira extração, reduzindo-se ainda mais na terceira (Figura 2).

Mendes (1986) conseguiu recuperar 25 e 20% de J2 de *M. javanica* pelos métodos de Cobb e de Jenkins (1964). Tihohod (1993) não recomenda um único método de extração para todas as situações encontradas no campo e no laboratório. Segundo Ferris (1987), a eficiência na separação do nematóide do solo depende, dentre outros fatores, do seu estágio de desenvolvimento, da textura e da umidade do solo. Entretanto, optou-se, no presente ensaio, por utilizar apenas substratos com textura arenosa visando facilitar a recuperação dos nematóides.

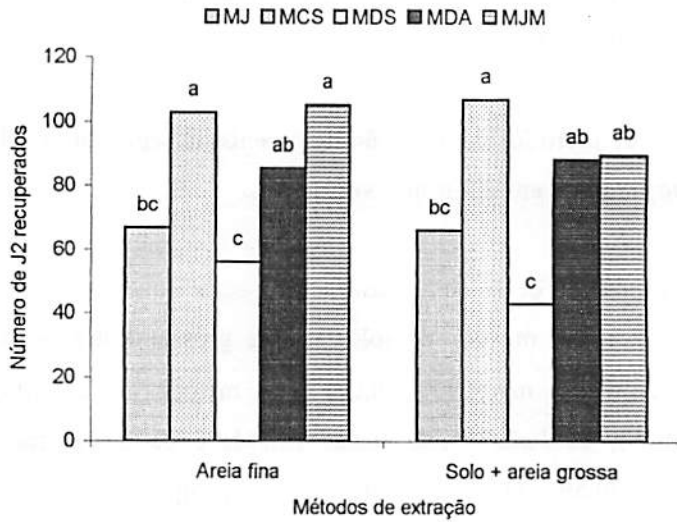


FIGURA 1- Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* recuperados pelos métodos de extração de Jenkins (MJ), centrifugação em sacarose (MCS), decantação em sacarose (MDS), decantação em água (MDA) e método de Jenkins (1964) modificado (MJM), nos substratos areia fina quartizifera e em mistura de solo + areia grossa (2:1). Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

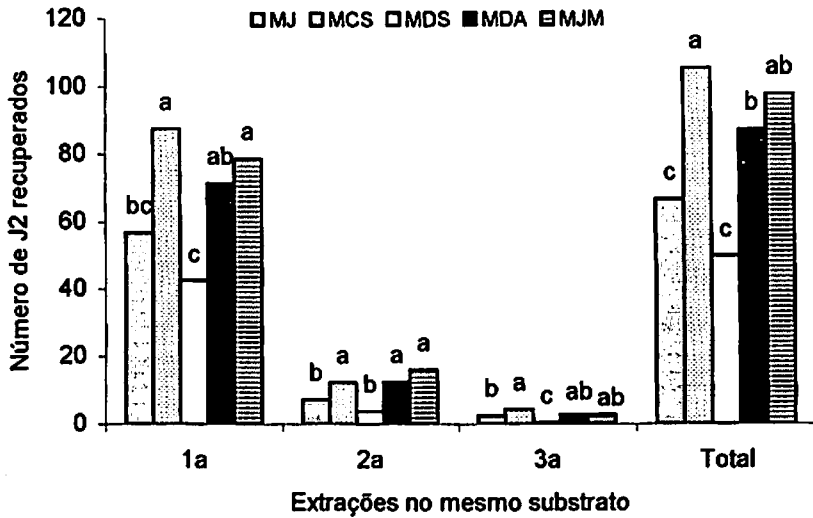


FIGURA 2- Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* recuperados pelo método de extração de Jenkins (MJ), centrifugação em sacarose (MCS), decantação em sacarose (MDS), decantação em água (MDA) e método de Jenkins (1964) modificado (MJM), após três extrações no mesmo substrato. Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.3 Reprodução e quantificação dos ovos em processo de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário e formação do juvenil de *Meloidogyne javanica* em diferentes períodos de tempo após a inoculação de tomateiro.

Apesar de *M. javanica* produzir ovos 20 dias da inoculação de J2, o número de ovos foi baixo até 24 dias. Aos 26 e 28 dias a produção de ovos foi significativamente maior ( $P \leq 0,05$ ) do que nos demais períodos (Figura 3). No início da reprodução de *M. javanica*, a avaliação dos ovos em processo de multiplicação celular, desenvolvimento embrionário e com juvenil formado foi diferenciada no período de 20 e 28 dias após a inoculação de J2. Os ovos de *M. javanica* produzidos aos 20 dias após a inoculação foram encontrados apenas no processo de multiplicação celular (Figura 3). Aos 22 dias, apenas 4,9% da população de ovos estavam no estágio de gástrula. A partir do 24º dia, a população se tornou bem diversificada, com ovos em todos os estádios e processos embrionários e já com juvenil formado. No 24º predominou a população pluricelular de ovos e o percentual de ovos nos primeiros estádios de desenvolvimento embrionário foi elevado, diminuindo até o estágio de juvenil formado. No 26º dia os estádios e processos dentro dos ovos se assemelharam ao do 24º dia, entretanto aumentou a porcentagem de ovos nos estádios de desenvolvimento embrionário e com juvenil formado. Já no 28º dia predominou, na população, ovos nos estádios de gástrula e com juvenil formado, respectivamente, 23,68% e 24,14%. Os ovos nos demais estádios do desenvolvimento embrionário diminuíram, bem como aqueles nos processos de multiplicação celular. Desta forma, neste período de tempo a população de ovos em multiplicação celular representou apenas 38,39% da população total.

Segundo Decker (1989), em condições favoráveis, a postura de *Meloidogyne* spp. inicia-se aos 22 dias após a inoculação dos J2.

Observou-se, ao longo do período de tempo decorrido após a inoculação (Figura 3), grande evolução no percentual de ovos nos estádios e processos avaliados até chegar ao juvenil, caracterizando, assim, bom inóculo para uso nas pesquisas. Entretanto, não se sabe se os ovos ainda no processo de multiplicação celular no 28º dia após a inoculação de J2 tiveram morte de células ou paralisação temporária da sua multiplicação celular. Guiran (1979) relatou que, entre 10 e 20% dos ovos de *M. incognita* tiveram o desenvolvimento embrionar comprometido após um período de 3 semanas de incubação. Bird (1972) encontrou 70% de eclosão *M. javanica* entre 10 e 13 dias de incubação de ovos no estágio de 2 célula, obtidos de plantas de tomate com 4 a 6 semanas de inoculadas. Já Rocha (2003) observou que mais de 80% dos ovos de *M. incognita* incubados por 7 dias em água eclodiram. Afinal, no ensaio realizado, 38,39% dos ovos no processo de multiplicação celular no 28º dia parecem indicar boa qualidade do inóculo, mesmo que destes ovos não ocorra eclosão de J2.

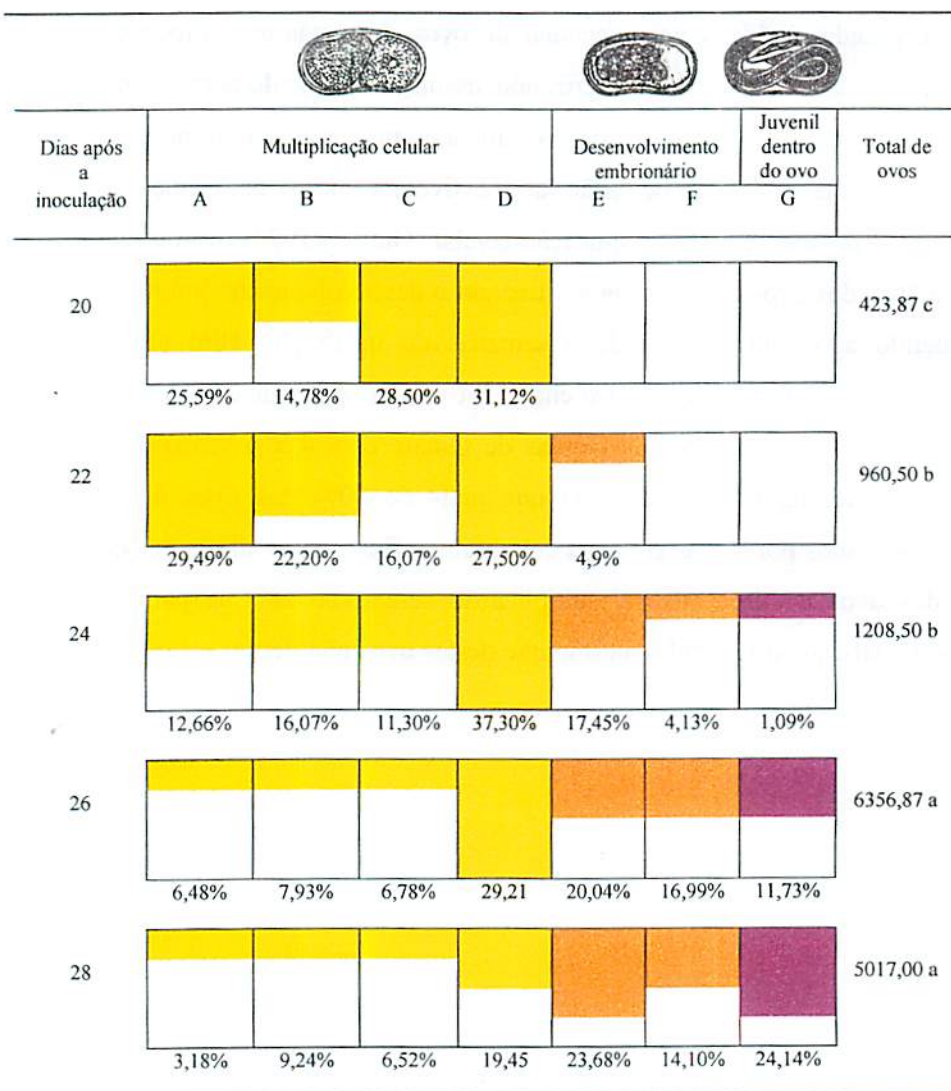


FIGURA 3- Desenvolvimento embrionário de ovos produzidos por *Meloidogyne javanica* no período de 20 a 28 dias após a inoculação de juvenis do segundo estágio (J2) em tomateiro. Fase de multiplicação celular (A = sem divisão celular; B = 2 células; C = 4 células; D = Pluricelular); Desenvolvimento embrionar (E = Gástrula; F = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionar (G = Juvenil dentro do ovo) e a percentagem de cada um deles. Numero total de ovos produzidos em cada período de tempo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.



## 6 CONCLUSÕES

1) A maior reprodução de *M. javanica* em tomateiro ocorreu quando a inoculação foi realizada na rizosfera da planta.

2) Os métodos de extração por centrifugação em sacarose (MCS), de Jenkins (1964) modificado (MJM) e o de decantação em água (MDA) foram mais eficientes na recuperação de J2 de *M. javanica*.

3) A fêmea de *M. javanica* desenvolvida em tomateiro a  $27 \pm 2^\circ$  C iniciou a postura aos 20 dias após a inoculação com J2, com maior população de ovos a partir de 26 dias da inoculação de J2.

4) A fêmea de *M. javanica* iniciou a postura com os ovos apenas na fase de multiplicação celular e aos 28 dias predominaram os estádios de gástrula e de juvenil formado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, V.F.; CAMPOS, V.P. Sobrevivência de *Meloidogyne exigua* no solo em raízes de cafeeiro no campo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 18, p. 147-150, 1993.
- ALVES, F.R.; CAMPOS, V.P. Efeito do aquecimento do solo na resistência de plantas a *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raça 3. *Nematologia Brasileira*, v. 25, n. 2, p. 153-162, 2001.
- BIRD, A.F. Influence of temperature on embryogenesis in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, v.4, p. 206-213, 1972.
- BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, v. 15, n.1, p. 142-143, 1983.
- CAMPOS, V.P. Sobrevivência de *Meloidogyne javanica* no solo e em raízes de tomateiros. *Summa Phytopathologica*, v. 13, p. 191-196, 1987.
- CAMPOS, V.P. et al. Manejo de nematóides em hortaliças. In: SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. *Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças*. Lavras: UFLA, 2001. p.125-158.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARVALHO, F.L.C.; KULCKYNSKI, S.M. Seleção de plantas para o controle de *Mesocriconema xenoplax* e *Meloidogyne* spp. através de rotação de culturas. *Nematologia Brasileira*, v. 22, n. 2, p. 41-48, 1998.
- DAVIDE, R.G.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes. I. Effect of infection density, age of host plant, and soil temperature. *Nematologica*, v. 13, p. 102-110, 1967.
- DECKER, H. *Plant nematodes and their control (Phytonematology)*. New York: E.J. Brill, 1989. 540 p.
- DUTRA, M.R. Manejo do solo e da água no controle de nematóides de galhas (*Meloidogyne* sp.) e estudos "in vitro" da temperatura e umidade na infectividade desses patógenos. 2002. 131p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- FERRIS, 1987. Extraction efficiency and population estimation. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. *Vistas on nematology*. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 59-63.
- GOMES, G.S.; HUANG, S.P.; CARES, J.E. Nematodes community, trophic structure and population fluctuation in soybean fields. *Fitopatologia Brasileira*, v.28, n.3, p. 258-266, 2003.
- GOODELL, P.B.; FERRIS, H. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, v.21, n.3, p.328-334, 1989.
- GUIRAN, G. A necessary diapause in root-knot nematodes. Observations on distribution and inheritance in *Meloidogyne incognita*. *Revue de Nématologie*, v.2, p.223-231, 1979.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report*, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1128, 1973.
- JENKINS, W.R.A. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, St. Paul, v. 48, n. 9, p. 692, Sept. 1964.
- LEE, D.L.; ATKINSON, H.J. *Physiology of nematodes*. New York: Columbia University, 1977. 215p.
- MENDES, M.L. *Análise comparativa de alguns métodos de extração de nematóides do solo*. 1986. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PROT, J.C.; VAN GUNDY, S.D. Influence of photoperiod and temperatura on migration of *Meloidogyne* juvenil. *Journal of Nematology*, v.13, n. 2, p. 217-219, 1981.
- ROCHA, F.S. *Fatores biológicos e químicos que afetam a eclosão, mobilidade, mortalidade e parasitismo de juvenis do segundo estágio de Meloidogyne incognita*. 2003. 207p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SHARMA, R.D. et al. Nematóides associados a genótipos de soja cultivados no Acre, Brasil. *Nematologia Brasileira*, v. 26, n. 1, p. 109-111, 2002.

TIHOHOD, D. *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372p.

WALLACE, H.R. The influence of temperature on embryonic development and hatch in *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, Leiden, v. 17, n. 2, p. 179-186, 1971.

## **CAPÍTULO 5**

**Local e quantificação da penetração de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* em raízes intactas e seccionadas de soja**

## 1 RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Local e quantificação da penetração de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* em raízes intactas e seccionadas de soja. In: \_\_\_\_\_. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. 2003. Cap. 5. p. 95-118. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Objetivou-se estudar o local e avaliar a capacidade de penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* ou de *Heterodera glycines* em segmentos de raiz de soja de 2 cm de comprimento e em raízes intactas e seccionadas em diferentes períodos de tempo. Observou-se que os J2 de *M. javanica* penetram tanto na coifa como na região de crescimento próximo ao meristema e no local seccionado do segmento da raiz de soja. Já a penetração dos J2 de *H. glycines* predominou na região de alongamento da raiz. Em qualquer período de tempo o número de J2 de *M. javanica* penetrados na região seccionada do segmento foi aproximadamente 3 vezes maior se comparado à coifa. Maior penetração de J2 de *M. javanica* ocorreu quando se plantou apenas um segmento em vez de 2 ou 3 no mesmo local. Porém, a penetração de J2 de *H. glycines* em segmento de raiz foi mais baixa do que *M. javanica*. A obstrução das duas extremidades do segmento com parafina resultou em 82,9% de redução na penetração tanto de *H. glycines* como de *M. javanica*. Porém, a obstrução apenas de uma extremidade aumentou a penetração de J2 de *M. javanica* na outra. Maior ( $P \leq 0,05$ ) número de J2 de *M. javanica* penetrou no segmento de raiz comparado com a planta intacta. Para *H. glycines*, maior ( $P \leq 0,05$ ) penetração de J2 ocorreu nas plantas intactas e nas seccionadas no colo, comparadas com as sem folhas e com o segmento de raiz.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Place and quantification of penetration of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines* in excised and non-excised roots of soybean. In: \_\_\_\_\_. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. Cap. 5. p. 95-118. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

This work aimed to study the place and to evaluate the penetration of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines* in roots of soybean, excised piece of two cm long, non-excised, plant with cutted shoot at different periods of time. J2 of *M. javanica* penetrated into root cap and growth region close to the meristem, as well as the cutted side of the root piece of soybean. J2 of *H. glycines* penetrated predominately into the elongation region of the root. In any period of time, the numbers of J2 of *M. javanica* penetrated into the cutted region of the 2 cm root piece was, approximately, 3 times as much as in the root cap. Greater penetration of J2 of *M. javanica* occurred when only one piece of root of two cm long was planted instead of two or three into the same place. However, the penetration of J2 of *H. glycines* in two cm long root piece was lower than *M. javanica*. The plugging of both tips of the root piece with paraffin resulted in 82,9% reduction on penetration either of *H. glycines* or *M. javanica*. However, the plugging of only one tip of the root piece increased the penetration of J2 of *M. javanica* into the other. Greater ( $P \leq 0,05$ ) number of J2 of *M. javanica* penetrated into the 2 cm root piece compared to non-excised root plant. Greater ( $P \leq 0,05$ ) penetration of J2 of *H. glycines* occurred in non-excised root plant and also in plants with cutted shoots compared to the root of plants without leaves and to the 2-cm root piece.

---

\* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

O sucesso do parasitismo do nematóide na raiz da planta se consuma com o seu desenvolvimento e reprodução. Entretanto, as fases anteriores a esse processo são essenciais para o nematóide, como, a atração e a penetração, as quais são influenciadas por substâncias liberadas pelas raízes no solo (Prot, 1980). Segundo Bird (1959) o exsudato radicular de tomateiro é essencial para atração e orientação dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e *M. hapla* para a região meristemática apical, local de grande exsudação radicular. Após o reconhecimento da superfície da raiz, os J2 de *M. javanica* agregam-se na ponta da raiz, mais especificamente na região de alongamento celular, onde iniciam a penetração movimentando-se entre as células epidérmicas (Wallace, 1973; Lewis, 1987).

Os J2 de *Heterodera* são atraídos por exsudatos radiculares e se direcionam para a região de alongamento e diferenciação, além de pontos onde as raízes laterais emergem (Wyss & Zunke, 1986; Young, 1992). As camadas de células epidérmicas são rompidas por força mecânica e pelas contínuas batidas com o estilete do nematóide. Ao rompê-las, os J2 penetram e migram intracelularmente nos tecidos do córtex da raiz (Hussey & Grundler, 1998). Contudo, a celulase produzida pela sua glândula subventral pode também facilitar ainda mais essa penetração (Smant *et al.*, 1998).

Embora o processo da penetração do J2 tenha sido detalhadamente descrito por vários autores (Wallace, 1973; Endo, 1971; Prot, 1980; Grundler & Wyss, 1995; Hussey & Williamson, 1998; Hussey & Grundler, 1998), necessita-se de comprovações experimentais sobre o papel dessa atração por substâncias emanadas dos tecidos da raiz nova. Da mesma, forma ainda se têm dúvidas sobre a possibilidade de penetração do J2 pela coifa bem como através de





tecidos laterais da raiz. Outro aspecto ainda obscuro é a penetração ou não de J2 de *Meloidogyne* ou de *Heterodera* em raízes com perda da extremidade onde ocorria o tecido meristemático. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar o local de penetração de J2 de *M. javanica* e de *H. glycines* em raízes intactas e seccionadas de soja, quantificando o processo ao longo de determinado intervalo de tempo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines*

Os juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* e de *H. glycines* foram obtidos conforme descrito no capítulo 2, em 4.1.

### 4.2 Efeito do tempo na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em segmentos de raiz de soja.

Sementes de soja da cultivar Embrapa-20 foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto, colocadas para germinar em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ . Após 8 dias da semeadura foram seccionadas radiculas normais e com bom crescimento a 2 cm da coifa chamado de segmento de raiz, e estes foram mantidos em água para evitar desidratação. Em tubo de ensaio contendo  $30 \text{ cm}^3$  de areia fina quartizífera autoclavada a  $120^\circ \text{C}$  por 20 minutos foram plantados um, dois ou três desses segmentos. Em seguida, a areia de cada tubo foi infestada com uma suspensão de 1 mL contendo 100 J2 de *M. javanica*, e mantidos em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Após 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas da inoculação, os segmentos de raízes foram retirados dos tubos jorrando água nas suas paredes. Foram, então, lavados e submetidos ao clareamento dos tecidos com hipoclorito de sódio a 1,5% durante 6 minutos, e enxaguados em água corrente para eliminar todo o resíduo. Em seguida, foram transferidos para tubos de vidro onde foi adicionada solução corante diluída até cobri-los, preparada com 3,5 gramas de fucsina ácida + 250 mL de ácido láctico + 750 mL de água destilada (adaptado de Byrd *et al.*, 1983)

e diluída 1: 29 (1mL de solução corante inicial + 29 mL de água destilada) e mantidos imersos por 2 minutos em banho-maria com água em ebulição. O resfriamento total foi feito em condições ambientes durante a noite. Os segmentos de raízes foram, então, lavados para eliminar o excesso de corante e recolocados nos tubos. Cobriram-se todos os segmentos com solução de glicerina 1:1 (glicerina pura + água destilada), os quais foram deixados em repouso por, no mínimo, duas horas. Em seguida foram montadas em lâmina de vidro, adicionando-se gotas de glicerina pura e sobrepondo outra lâmina de vidro, e analisadas em microscópio. Em cada período de tempo quantificou-se o número total de J2 dentro dos segmentos, de J2 na região de crescimento e na região do corte.

Foi empregado o delineamento estatístico inteiramente casualizado em fatorial 3 x 6, com 3 conjuntos de segmentos e períodos de avaliação, em 6 repetições.

O número de J2 na região de crescimento foi transformado em raiz de  $x + 0,5$  para a realização da análise de variância.

#### **4.3 Efeito do posicionamento de segmentos de raiz de soja na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* ou de *Heterodera glycines*.**

Segmentos de raiz com 2 cm de comprimento foram obtidos de soja. Em cada tubo de ensaio contendo 30 cm<sup>3</sup> de areia fina quartizífera, autoclavada e umedecida, foi introduzido um segmento de raiz com a região do corte para cima ou para baixo, seguido da infestação com 1mL da suspensão contendo 100 J2 de *M. javanica* ou *H. glycines*. A seguir, foram mantidos em câmara a  $27 \pm 2^\circ$  C, posicionados na horizontal ou verticalmente.

Foi empregado o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com

4 tratamentos formados por duas posições de plantio do segmento e duas da inclinação dos tubos, em 6 repetições.

Após 72 horas da inoculação, os segmentos foram retirados dos tubos, lavados e submetidos ao clareamento dos tecidos. Seguiu-se a coloração dos J2 dentro da raiz, e a montagem das lâminas em glicerina para observação microscópica. Quantificaram-se o número de J2 de *M. javanica* e de *H. glycines* na região de crescimento e de corte do segmento nas diferentes posições durante a inoculação.

O número total de J2 de *M. javanica* e de J2 de *H. glycines* foram transformados em raiz de  $x + 0,5$  para a realização da análise de variância.

#### **4.4 Efeito da obstrução das extremidades do segmento de raiz na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* ou *Heterodera glycines*.**

Segmentos de raiz com 2 cm de comprimento foram obtidos de soja. A extremidade de cada segmento foi imersa em parafina numa extensão de apenas 3 mm. No outro tratamento imergiram-se as duas extremidades do segmento. Como testemunha, segmentos não foram imersos em parafina. Após esses tratamentos, os segmentos foram plantados em tubos de ensaio com areia quartzífera e inoculados com 1mL da suspensão contendo 100 J2 de *M. javanica* ou *H. glycines*. A seguir foram mantidos em câmara a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 6 repetições.

Após 72 horas da inoculação, os segmentos foram retirados dos tubos, lavados e submetidos ao clareamento dos tecidos. Seguiu-se a

coloração dos J2 dentro da raiz e a montagem das lâminas com glicerina para observação microscópica. Quantificou-se o número de J2 de *M. javanica* e de *H. glycines* na região de crescimento e na do corte dos segmentos.

Os dados foram transformados em raiz de  $x + 0,5$  para realização da análise de variância.

#### **4.5 Penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* em plantas intactas e seccionadas.**

Aos oito dias da semeadura de soja do cultivar Embrapa-20 em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada, foram seccionadas: a) radículas normais e com bom crescimento a 2 cm da coifa, chamado de segmento de raiz; b) no colo, eliminando a parte aérea. Nos outros tratamentos utilizaram-se plantas normais (testemunha) e sem folhas, porém com caulículo. As raízes sem caule, o segmento de raiz, a planta sem folhas e a normal (testemunha) foram transplantados para tubos contendo areia fina quartizífera. Em seguida foram infestados com uma suspensão de 1 mL contendo 100 J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines*, e mantidos em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Foi empregado o delineamento estatístico inteiramente casualizado, utilizando 4 tratamentos e 6 repetições.

Aos 3 dias após a inoculação, os sistemas radiculares e o segmento da raiz foram retirados dos tubos jorrando água nas suas paredes. As raízes e o segmento foram, então, lavados e submetidos ao clareamento dos tecidos. Em seguida foram submetidos ao processo de coloração dos J2 dentro da raiz e à montagem das lâminas em glicerina para observação

microscópica. Quantificou-se o número de J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines* dentro de cada secção de raiz e do segmento.

Em todos os ensaios descritos utilizou-se, na análise de variância, o programa Sisvar e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* penetraram tanto na região de crescimento como no local seccionado do segmento da raiz de soja. Ao penetrarem, os J2 de *M. javanica* se aglutinaram no local de crescimento (Figura 1A). J2 de *H. glycines* penetraram lateralmente na raiz e se movimentaram para o cilindro central (Figura 1B).

Siddiqui (1971), trabalhando com *M. naasi* em trigo e aveia, observou agregação dos J2 na ponta da raiz antes de iniciar a penetração. Bird (1959) observou também em raiz de tomateiro, grande agregação de J2 de *Meloidogyne javanica* e de *M. hapla* na região de crescimento.

### 5.1 Efeito do tempo na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em segmentos de raiz de soja.

Em qualquer período de tempo o número de J2 de *M. javanica* penetrados na região seccionada do segmento foi aproximadamente 3 vezes maior do que na coifa e circunvizinhanças. Considerando o total de J2 no segmento de raiz, maior número ( $P \leq 0,05$ ) penetrou às 12 e 72 horas após a inoculação (Figura 2). Entretanto, quando se testou a penetração utilizando, em cada recipiente, 1, 2, ou 3 segmentos, a penetração foi mais elevada ( $P \leq 0,05$ ), tanto na coifa quanto no local seccionado, quando cada recipiente recebeu apenas 1 segmento de raiz de soja. Porém, não houve diferença quando se utilizaram 2 ou 3 deles (Figura 3). Mas se confirmou, aproximadamente, penetração 3 vezes maior de J2 na região seccionada do que na coifa (Figura 3).

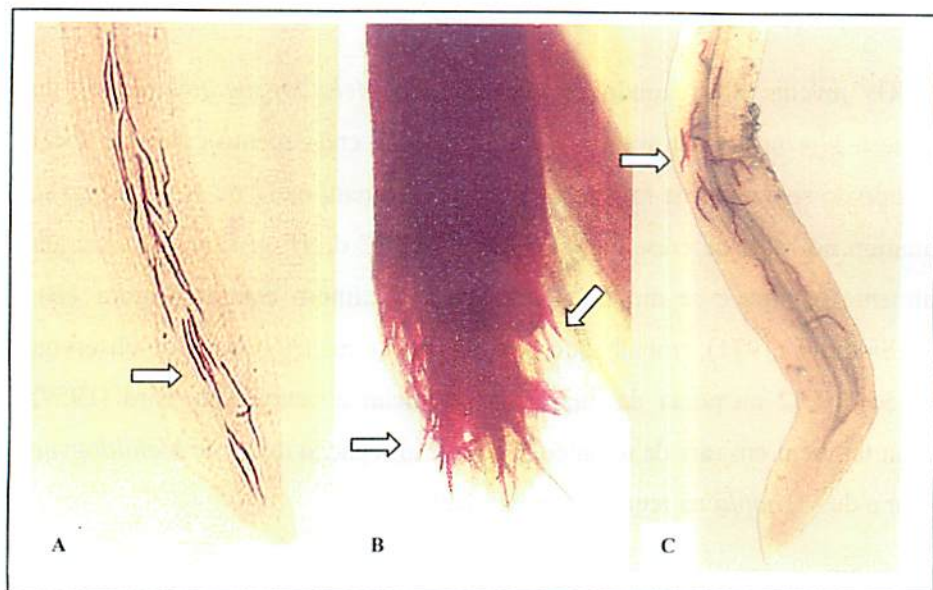


FIGURA 1- Locais de penetração de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* na raiz de soja. A) Juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* na região de crescimento da raiz e próximo a coifa; B) J2 de *M. javanica* no local seccionado; C) J2 de *H. glycines* após a região de crescimento da raiz e distante da coifa.

A maior penetração de J2 na região seccionada pode estar ligada à maior liberação de substâncias provenientes dos vasos cortados com capacidade atrativa do J2. Lewis (1987) sugeriu, além da região de crescimento, lesões e fendas ao longo das raízes da planta como pontos de penetração de J2 de *Meloidogyne*. Da mesma forma, Prot (1980) também sugeriu a possibilidade de penetração de J2 de *Meloidogyne* através de orifícios ou aberturas causadas pela penetração de outros J2.



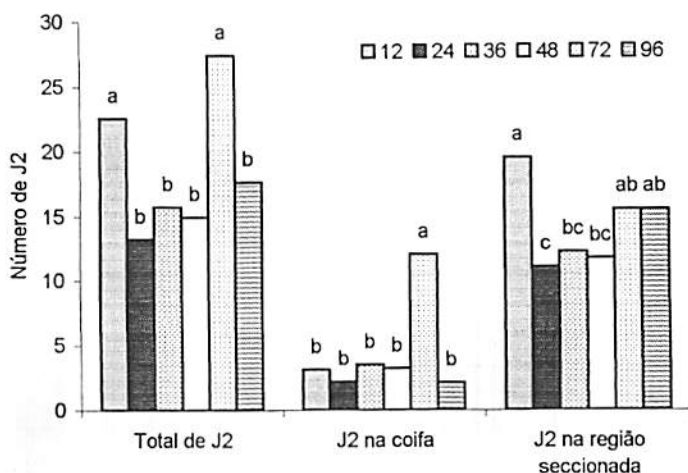


FIGURA 2- Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, de J2 que penetrou pela coifa e pelo local de corte do segmento da raiz de soja, em diferentes períodos de tempo após a inoculação. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A maior penetração quando se utilizou apenas um segmento pode explicar o direcionamento dos J2 para apenas uma fonte de atração, tornando-os, assim, mais eficazes. Entretanto, ao se colocarem 2 ou 3 segmentos, maior concentração de exsudato pode ter sido produzido e, assim, tornando-se tóxico ou causando dormência temporária no J2, diminuindo a penetração em períodos pequenos de tempo. Zhao *et al.* (2000) observaram imobilidade em 80% dos J2 de *M. incognita* quando em contato com exsudato das células das bordos de alfafa, feijão e ervilha. Redução na mobilidade também foi observada por Campos *et al.* (2002) em J2 de *M. javanica* expostos em exsudato de *Brachiaria*

*decumbens*. Rocha (2003) verificou que o exsudato de soja causou redução na mobilidade e penetração de J2 de *M. incognita* em raiz de soja.

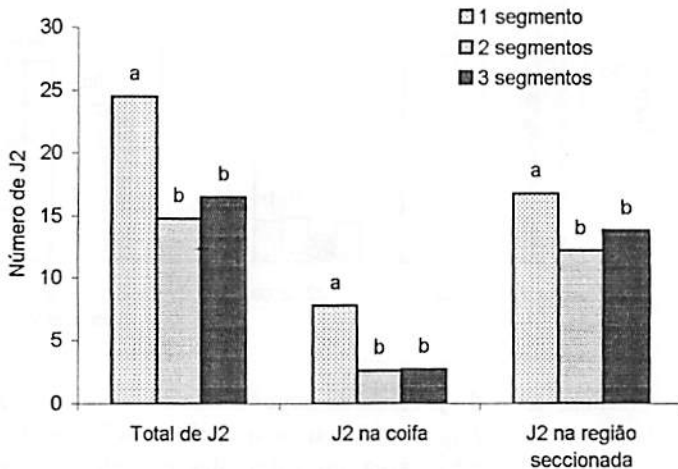


FIGURA 3- Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, de J2 que penetraram pela coifa e pela secção do segmento de raiz de soja quando 1, 2 ou 3 segmentos foram colocados por recipiente, 72 horas após a inoculação. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.2 Efeito do posicionamento de segmentos de raiz de soja na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* ou *Heterodera glycines*.

No total de J2 de *M. javanica* que penetrou no segmento, maior ( $P \leq 0,05$ ) número ocorreu quando a região de crescimento foi posicionada para o fundo do tubo independente de ser mantido na vertical ou na horizontal, e

naqueles onde a região seccionada foi posicionada para o fundo do tubo e este mantido na horizontal (Figura 4). Na região de crescimento, maior ( $P \leq 0,05$ ) penetração de J2 ocorreu quando o tubo de ensaio foi mantido na vertical, indiferente do posicionamento da região de crescimento do segmento de raiz. Na região seccionada, o maior número de J2 foi observado quando o tubo foi mantido na horizontal, porém com a região de crescimento posicionada para a base do tubo, seguido dos tratamentos onde os tubos foram mantidos na vertical (Figura 4).

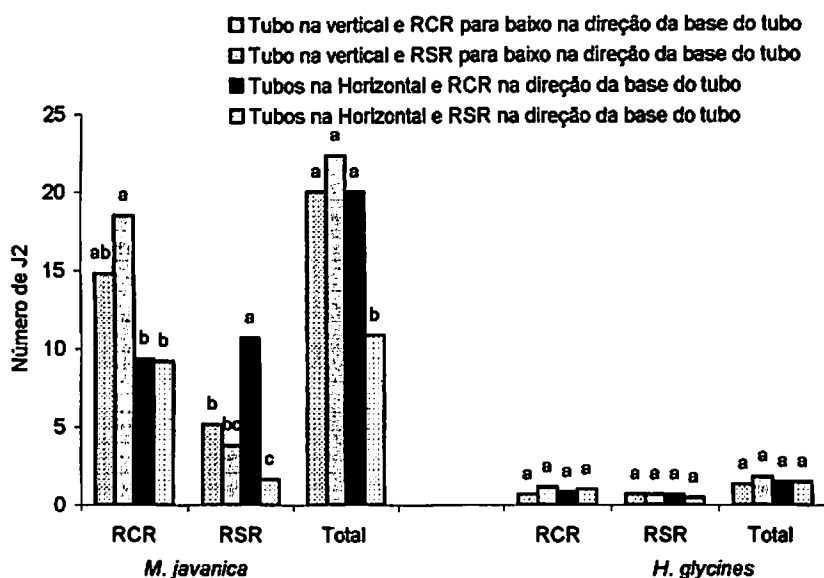


FIGURA 4- Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* penetrados em segmentos de raiz de soja colocados em tubos de ensaio posicionados na vertical ou horizontal, número de J2 que penetraram pela região de crescimento da raiz (RCR) e pela região seccionada (RSR) após 72 horas da inoculação. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A penetração de J2 de *H. glycines* no segmento de raiz foi mais baixa que a de J2 de *M. javanica* e por isso não diferenciou nenhuma das formas de posicionamento desses segmentos (Figura 4). A baixa penetração indica, talvez, que a atração exercida pelo segmento de raiz foi deficiente. Este processo de atração do J2 de *H. glycines* deve ser diferenciado daquele de *M. javanica*.

O número de J2 de *M. javanica* penetrados no segmento de raiz com a região de crescimento ou região seccionada posicionada para o fundo do tubo, e este mantido na vertical ou na horizontal, reflete na capacidade de movimentação e atração do J2 para os locais de penetração, independentemente do seu posicionamento. Os exsudatos liberados pela região de crescimento e pela região seccionada do segmento de raiz e diluídos no solo, também podem ter contribuído para maior penetração desse nematóide. Segundo Gourd *et al.* (1993) a capacidade de penetração do J2 de *M. javanica* pode estar relacionada com a eficiência de sua movimentação até a raiz. Entretanto, Gommers & Voor In'Tholt (1976) relataram que os exsudatos radiculares liberados pelas plantas na solução do solo também podem atrair o nematóide para as raízes. Da mesma forma, Bird (1959) observou que em raiz de tomateiro, o maior direcionamento de J2 de *Meloidogyne javanica* e de *M. hapla* ocorreu na região de crescimento devido a grande concentração de exsudato nesse local.

### 5.3 Efeito da obstrução das extremidades do segmento de raiz na penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* ou *Heterodera glycines*.

Em relação ao total de J2 de *M. javanica*, maior ( $P \leq 0,05$ ) penetração ocorreu no segmento sem nenhuma obstrução nas extremidades, comparado com aquele em que as duas extremidades foram obstruídas, chegando à redução de 82,9% na penetração. Embora a obstrução na região de crescimento tenha

proporcionado menor penetração de J2 de *M. javanica* do que aquela na região do corte, não houve diferença entre si e nem daquela sem obstrução (Figura 5). Em qualquer das extremidades obstruídas não ocorreu penetração. Entretanto, quando só uma extremidade foi obstruída, a penetração de J2 de *M. javanica* aumentou na outra e se tornou semelhante ( $P \leq 0,05$ ) àquela sem obstrução (Figura 5).

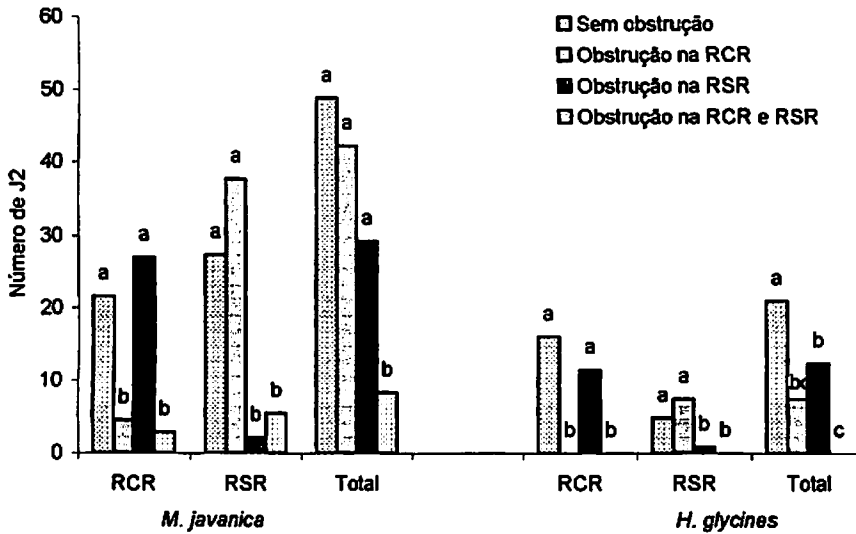


FIGURA 5. Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* ou *Heterodera glycines*, de J2 penetrados na região de crescimento da raiz (RCR) e de J2 penetrados na região seccionada (RSR) de segmento de raiz de soja obstruídos ou não nas extremidades, após 72 horas da inoculação. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No total de J2 de *H. glycines* ocorreu maior ( $P \leq 0,05$ ) penetração no segmento sem nenhuma obstrução nas extremidades, comparado com aquele onde as duas extremidades foram obstruídas (Figura 5) e semelhante aos resultados obtidos com a penetração de J2 de *M. javanica*. Entretanto, para *H. glycines*, quando se obstruiu apenas uma das extremidades, ocorreu redução significativa na penetração, comparada com aquele segmento sem obstrução. Embora a penetração de *H. glycines* tenha sido menor do que a ocorrida com os J2 de *M. javanica*, a obstrução de qualquer extremidade não permitiu penetração, porém proporcionou aumento na outra extremidade não obstruída, como ocorrido também para *M. javanica*.

A redução de 82,9% na penetração de J2 de *M. javanica* com a obstrução das duas extremidades do segmento comprova que as substâncias atrativas são liberadas dessas extremidades e influenciam no direcionamento dos J2 para o local de penetração. Este fato torna-se evidente com a ocorrência de grande penetração numa extremidade quando a outra é obstruída. Assim, comprova que a penetração ocorre diretamente nas extremidades e raramente nas laterais do segmento. Wieser (1955 e 1956) caracterizou os 2 cm distais das raízes de tomate, feijão, soja e berinjela como região de repelência para o J2 de *M. hapla*, o que não ocorreu nos ensaios realizados, já que a obstrução desta área afetou a penetração. O autor também relatou que a penetração só ocorre em raízes intactas, contudo, nos ensaios realizados, eles penetraram em segmento destacado da raiz.

Zhao *et al.* (2000) observaram que J2 de *M. incognita* foram atraídos e se acumularam rapidamente ao redor da região apical das raízes de ervilha, envolvida por células da borda com mucilagem de alto peso molecular. Segundo Faria *et al.* (2003), após o direcionamento do nematóide para a fonte de alimento em resposta aos sinais químicos emitidos pelo hospedeiro na forma de

exsudatos, a fase infectiva dos fitonematóides inicia logo em seguida, com a interação com o hospedeiro.

#### 5.4 Penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* em plantas intactas e seccionadas.

Maior número ( $P \leq 0,05$ ) de J2 de *M. javanica* penetraram no segmento da raiz, comparado com a planta intacta. Porém, os J2 penetraram em menor número nas raízes das plantas seccionadas no colo e sem folhas, sem diferir significativamente daqueles do segmento (Tabela 1). Para *H. glycines*, maior ( $P \leq 0,05$ ) penetração de J2 ocorreu nas plantas intactas e seccionadas no colo, comparadas com aquelas sem folhas e com o segmento (Tabela 1).

TABELA 1. Penetração de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* ou de *Heterodera glycines* em segmento de raiz de soja, planta seccionada no colo, sem folhas e intactas.

Tratamentos	Número de J2 de <i>M. javanica</i>	Número de J2 de <i>H. glycines</i>
Segmento de raiz	50,83 a	5,33 b
Planta sem folhas	39,83 a b	8,00 b
Seccionada na região do colo	40,16 a b	13,50 a
Intacta	27,00 b	16,00 a
CV %	26,41	28,69

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Maior penetração no segmento da raiz pode estar relacionado ao direcionamento mais preciso dos J2 para uma única fonte de atração. Enquanto

nas raízes a diversidade de fontes de atração pode confundir o direcionamento desses J2. Por outro lado, maior número de locais de atração pode produzir muitas substâncias que, em alta concentração, passam a ser tóxicas ao J2 de *M. javanica*, como encontrado por Rocha (2003) quando J2 de *M. incognita* foi colocado em contato com exsudato de soja. Campos *et al.* (2002), trabalhando com exsudato de *Brachiaria decumbens*, observaram a sua toxicidade em J2 de *M. javanica*. Zhao *et al.* (2000) também verificaram efeito tóxico de exsudato de células da borda obtidos de raízes de ervilha, alfafa e feijão em J2 de *M. incognita*.

Essa maior atração quando o número de locais é restrito na rizosfera, como aconteceu no segmento de raiz, pode trazer conseqüentes danos para a raiz, causando provavelmente, morte e levando a destruição da planta se isto acontecer com sementes em germinação onde a rizosfera se resume em poucas radículas. Dropkin (1969) relatou que, independente da reação de resistência, quando cultivares são semeados em locais com altas populações de juvenis infectivos do nematóide compatível, resulta em alta redução na emergência desses cultivares. Campos (1979), trabalhando com dois cultivares de soja resistentes a *Phytophthora megasperma*, porém resistente e suscetível a *H. glycines*, encontrou redução do estande devido a infestação de *H. glycines* na linha de germinação de ambas cultivares. De acordo com Kinloch (1982) para cada J2 de *M. incognita* presente em amostras de 10 cm<sup>3</sup> de solo da planície costeira do estado da Flórida, EUA, coletadas no inverno, corresponde a uma redução de 5,31 Kg de sementes de soja por hectare, ou seja, na redução do estande.



## 6 CONCLUSÕES

1) Os J2 de *M. javanica* penetraram pela região de crescimento e coifa e os de *H. glycines* apenas lateralmente na região de crescimento e ao longo do segmento da raiz de soja.

2) Os J2 de *M. javanica* penetraram eficientemente em raízes seccionadas, mas não os de *H. glycines*.

3) A obstrução da extremidade do segmento da raiz aumentaram a penetração de *M. javanica* e de *H. glycines* na outra não obstruída.

4) No segmento da raiz ocorreu maior penetração de *M. javanica* do que de *H. glycines*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRD, A.F. The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica*, Leiden, v. 4, p. 322-335, 1959.
- BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, v. 15, n.1, p. 142-143, 1983.
- CAMPOS, H.D. et al. Efeito de exsudato radicular de *Brachiaria decumbens* sobre a eclosão e mobilidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 27, p. 185-186, 2002.
- CAMPOS, V. P. Soybean response resulting from single or combined inoculation with *Phytophthora megasperma* var. *sojae* and *Macroposthonia ornata* or *Heterodera glycines*. 1979. 75 p. Thesis (Doctor of Philosophy)-Department of Plant Pathology, Faculty of North Carolina State University.
- DROPKIN, V.H. Celular responses of plants to nematodes infections. *Annual Review Phytopathology*, v. 7, p. 101-121, 1969.
- ENDO, B.Y. Nematode-induced syucytia (giant cells). Host-parasite relationships of Heteroderidae. In: ZUCKERMAN, B.M.; MAI, W.F.; ROHDE, R.A. *Plant parasitic nematodes*. New York: Academic, 1971, v.2, p.91-117.
- FARIA, C.M.D.R. et al. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematóide-planta. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 11, p. 373-410, 2003.
- GOMMERS, F.J.; VOOR IN' THOLT, D.J.M. Chemotaxonomy of compositae related to their host suitability for *Pratylenchus penetrans*. *Netherland Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 1-8, 1976.
- GOURD, T.R.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R. Penetration rates by second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. *Journal of Nematology*, Raleigh, v. 25, n. 1, p. 38-41, 1993.
- GRUNDLER, F.M.W.; WYSS, U. Strategies of root parasitism by sedentary plant parasitic nematodes. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U.S.; SINGH, R.P.

**Pathogenesis and host specificity in plant diseases.** Oxford.: Elsevier Science, 1995. v.2, p. 309-319.

**HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R.** A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1128, 1973.

**HUSSEY, R.S.; GRUNDLER, F.M.W.** Nematode parasitism of plant. In: **PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J.** **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes.** New York: CABI, 1998. p.213-244.

**HUSSEY, R.S.; WILLIAMSON, V.M.** Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. In: **BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L.** **Plant and nematode interactions.** Hardcover: American Society of Agronomy, 1998. p.87-108.

**KINLOCH, R.A.** The relationship between soil populations of *Meloidogyne incognita* and yield reduction of soybean in the coastal plain. **Journal of Nematology**, Deleon Sprins, v. 14, n. 2, p. 162-167, 1982.

**LEWIS, S. A.** Nematode-plant compatibility. In: **VEECH, J.A.; Dickson, D.W.** (Ed.). **Vistas on nematology.** Hyattsville, M. D.: Society of Nematologists, 1987. p. 246-252.

**NIBLACK, T.L.** The race concept. In: **RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A.** (Ed.). **Biology and management of the soybean cust nematode.** St. Paul: APS, 1992. p. 73-86.

**PROT, J.C.** Migration of plant-parasitic nematodes towards plant roots. **Revue Nématologie**, v.3, n.2, p.305-318, 1980.

**ROCHA, F.S.** Fatores biológicos e químicos que afetam a eclosão, mobilidade, mortalidade e parasitismo de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. 2003. 207p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

**SIDDIQUI, I.A.** Comparative penetration and development of *Meloidogyne naasi* in wheat and oat roots. **Nematologica**, v. 17, p. 566, 1971.

**SMANT, G. et al.** Endogenous cellulases in animals: isolation of  $\beta$ -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes.

**Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.95, p.4906-4911, 1998.

**WALLACE, H.R.** Nematode ecology and plant disease. New York: Crane, Russak & Company, 1973. 228 p.

**WIESER, W.** The attractiveness of plants to larvae of root-knot nematodes. I. The effect of tomato seedlings and excised roots on *Meloidogyne hapla* Chitwood. **Proceeding of the Helminthological Society**, v. 22, n. 2, p. 106-112, 1955.

**WIESER, W.** The attractiveness of plants to larvae of root-knot nematodes. II. The effect of excised bean, eggplant and soybean roots on *Meloidogyne hapla* Chitwood. **Proceeding of the Helminthological Society**, v. 23, n. 1, p. 59-64, 1956.

**WYSS, U; ZUNKE, U.** Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. **Revue Nématologie**, v. 9, n.2, p. 153-165, 1986.

**YOUNG, L.D.** Epiphytology and life cycle. In: **RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A.** (Ed.). **Biology and management of the soybean cust nematode**. St.Paul: APS, 1992. p. 27-36.

**ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C.M.** Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1239-1245, 2000.

## **CAPÍTULO 6**

**Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) na penetração e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em soja**

## 1 RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) na penetração e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em soja. In:\_\_\_\_\_. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. Cap. 6. 2003. p. 119-145. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A temperatura ambiente e o teor de lipídio no corpo do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* afetam seu parasitismo no hospedeiro. Assim, neste trabalho estudou-se a relação do lipídio e da temperatura com o período de incubação do J2 de *M. javanica* em água e o parasitismo em soja. O teor de lipídio no J2 diminuiu significativamente em cada período de incubação no intervalo de 2 a 12 dias, chegando a 56,12% de queda aos 4 dias de incubação. Quando os J2 foram incubados em água, por 2 dias, e em seguida, inoculados em soja, ocorreram quedas significativas na penetração, número de fêmeas e na reprodução. Entretanto a patogenicidade dos J2 foi mantida até 12 dias de incubação, porém com redução de 67,36%, 82,75% e 86,09% no número de J2 penetrados, fêmeas e massa de ovos, respectivamente. Noutro ensaio, os J2 foram incubados em água com temperaturas fixas de 5° C, 10° C e 28° C e em temperaturas variadas de 10 horas a 5° C ou 10° C e complementada com 14 horas a 28° C, e analisada sua patogenicidade pela inoculação em soja a cada 5 dias de incubação durante 20 dias, avaliando-se o número de J2 penetrado, de fêmeas, massas de ovos, total de ovos. Em cada período avaliado, a incubação dos J2 em temperaturas fixas de 5° C, 10° C e 28° C afetaram significativamente as variáveis avaliadas, sendo mais detrimental a 5° C e menos a 10° C, e intermediário a 28° C. As temperaturas variadas comportaram-se como a fixa a 28° C, com tendência para melhoria da patogenicidade quando alterada com 10° C. A incubação por 20 dias levou à redução drástica da patogenicidade em qualquer temperatura de incubação.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Effect of timing and temperature of incubation of second stage juveniles (J2) on penetration and reproduction of *Meloidogyne javanica* in soybean. In: \_\_\_\_\_. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. Cap. 6. p. 119-145. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

The environmental temperature and the lipid content of the body of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne javanica* affect its parasitism on the host. So, in this work, was studied the relationship of lipid and temperature during incubation period in water of J2 of *M. javanica* from 2 to 12 days and parasitism in soybean. The lipid content of J2 body decreased significantly in each period of incubation from 2 to 12 days, reaching 56,12% decrease on four days of incubation. When J2 were incubated in water for 2 days, followed by inoculation in soybean, significant decrease occurred in penetration, number of females and reproduction. However, the pathogenicity of J2 was kept until 12 days of incubation with reduction of 67,36%, 82,75% and 86,09% on the number of penetrated J2, females and eggs mass, respectively. In another assay, the J2 were incubated in water at fixed temperatures of 5° C, 10° C and 28° C, and at varied temperatures of 10 hours at 5° C or 10° C and complemented with 14 hours at 28° C, and checked their pathogenicity by inoculating in soybean, the J2 incubated by every 5 days during 20 days period and evaluating the numbers of penetrated J2, females, egg mass and total egg. In each evaluated period, the incubation of J2 at fixed temperatures of 5° C, 10° C and 28° C affected, significantly the evaluated variables. The least, good and intermediate pathogenicity occurred when J2 were incubated at fixed temperature of 5° C, 10° C and 28° C. The effect of varied temperatures was similar to fixed 28° C with tendency of better pathogenicity when alternated with 10° C. The incubation by 20 days led to a drastic reduction on pathogenicity in any tested incubation temperature.

---

\* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

O juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. desempenha papel importante no ciclo de vida deste patógeno. Inicialmente dentro do ovo pode sobreviver às condições inadequadas à relação nematóide-planta. Após a eclosão movimenta-se pelo solo, penetra nas raízes e exerce o parasitismo na planta (Agrios, 1997; Campos *et al.*, 2001). O J2, portanto, vive em 3 ambientes bem distintos; dentro do ovo, no solo e na planta. No solo, passa por condições variáveis de temperatura e umidade (Van Gundy, 1985). A temperatura é um fator que tem proporcionado maior influência na capacidade de penetração, desenvolvimento e reprodução de várias espécies de *Meloidogyne*. Segundo Fan & Hominick (1991), o tempo de exposição do nematóide à baixa temperatura também pode influenciar grandemente a capacidade de parasitismo em seu hospedeiro. Ainda não se conhece o efeito de variações térmicas na capacidade de penetração, desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne* em seu hospedeiro.

Para viver em diversos ambientes antes de obter alimento, o J2 traz consigo 30% do seu peso corporal em lipídios, que constituem a principal fonte energética para os gastos até obter alimento quando parasitar seu hospedeiro (Lee & Atkinson, 1977; Van Gundy, 1985). As condições ambientais, contudo, vão determinar o nível dessas reservas lipídicas do J2, podendo interferir na sua infectividade (Christophers *et al.*, 1997). As perdas dessas reservas estão em função da duração do tempo que o J2 passa sem se alimentar e pode variar com a espécie de *Meloidogyne* (Reversat, 1981). A reserva nutricional do J2, aliada à temperatura adequada e à compatibilidade com o hospedeiro, também podem proporcionar maior rapidez de penetração e estabelecimento do sítio de alimentação (Endo, 1987). Portanto, a correlação entre nível lipídico do J2 e o



sucesso no parasitismo de *Meloidogyne* ainda necessitam de muitos estudos. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar: a) nível de lipídio corporal do J2 e sua relação com a penetração, desenvolvimento e reprodução de *M. javanica* em soja após períodos de incubação em água; e b) efeito de temperaturas fixas e variadas na penetração, desenvolvimento e reprodução de *M. javanica*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica*.

Os juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* foram obtidos conforme descrito no capítulo 2 em 4.1.

### 4.2 Influência do tempo de incubação no percentual de lipídios neutros de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Suspensões de J2 de *M. javanica* foram incubadas por zero, 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 dias em água parada a 28° C. De cada período de incubação foi coletada uma suspensão de 5 mL de J2 de *M. javanica*, concentrando-a para 0,5 mL. Nela foi estudada a concentração de lipídios neutros no corpo do J2 através de método colorimétrico empregando-se o corante “Oil Red O” (Storey, 1983; Christophers *et al.*, 1997). Para isso, preparou-se uma solução corante, utilizando 0,5g do corante Oil Red O em 100 mL de álcool absoluto. Agitou-se por 15 minutos, seguido de filtração em papel de filtro Whatman nº 1 e armazenamento a 5° C em frasco de vidro sob a proteção de luz. Toda a vidraria utilizada no preparo da solução do corante foi previamente limpa e esterilizada.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado com 7 períodos de tratamento do inóculo em 4 repetições.

Sobre a suspensão concentrada em 0,5 mL de J2 adicionaram-se 3 mL da solução corante “Oil Red O”. Em seguida, foi aquecida em banho-maria a 60° C por 20 minutos. Após o total resfriamento em temperatura ambiente, os J2, já com o teor de lipídio neutro colorido de vermelho em seu corpo, foram concentrados em 0,5 mL da solução corante através de centrifugação a 2000 rpm

por 1 minuto. Adicionaram-se 3 mL de solução formada de água destilada + glicerina pura (1:1) e armazenada em temperatura ambiente. Em seguida montaram-se lâminas dos J2 de cada tratamento. Como a coloração nos J2 de cada tratamento foi visualmente homogênea, em microscópio tri-ocular foram obtidas fotografias de 4 J2 por tratamento. A partir das fotografias dos J2 foi estimada a área total do corpo do J2 e a aquela de coloração vermelha correspondendo à de lipídios. Para isto, utilizou-se o programa “*Image Tool for Windows*”, versão 3.0. Assim, a partir da área de coloração vermelha obteve-se o percentual de lipídios neutros em relação à área total do corpo do J2.

#### **4.3 Influência do tempo de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na capacidade de penetração, desenvolvimento e reprodução em raiz de soja.**

Sementes de soja da cultivar Embrapa-20 foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto, colocadas para germinar em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ . Após 3 dias da semeadura, as sementes germinadas, com radícula de 2 cm, foram transferidas para tubos de ensaio contendo  $30 \text{ cm}^3$  de areia fina quartizífera umedecida e previamente autoclavada a uma temperatura de  $120^\circ\text{C}$ , por 20 minutos. Vinte quatro horas após, infestou-se a areia de cada tubo com suspensão de 1 mL contendo 100 J2 de *M. javanica*, previamente incubados por zero, 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 dias em água parada a  $28^\circ \text{C}$ , da mesma forma que foram incubados os J2 utilizados na coloração com “Oil Red O”. Em seguida, os tubos contendo as plantas inoculadas foram colocados em sala climatizada com temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado com 7 períodos de incubação do inóculo e 6 repetições.

Aos 4 e 20 dias após a inoculação, as plantas foram retiradas jorrando água nas bordas dos tubos. Os sistemas radiculares foram lavados e submetidos ao clareamento das raízes em hipoclorito de sódio a 1,5% por 6 minutos para raízes com 4 dias de inoculação e por 10 minutos para aquelas com 20 dias. As raízes foram enxaguadas em água corrente para eliminar todo o resíduo de hipoclorito de sódio. Em seguida foram transferidas para tubos de vidro onde foi adicionada uma solução corante diluída até cobri-las, preparada com 3,5 gramas de fucsina ácida + 250 mL de ácido láctico + 750 mL de água destilada (adaptado de Byrd *et al.*, 1983) e diluída 1: 29 (1 mL de solução corante inicial + 29 mL de água destilada). As raízes foram mantidas, imersas no corante por 2 minutos em banho-maria com a água em ebulição. O resfriamento total foi feito em condições ambiente durante a noite. As raízes foram, então, lavadas para eliminar o excesso de corante e recolocadas nos tubos. Cobriram-se todas elas com solução de glicerina 1:1 (glicerina pura + água destilada) as quais foram deixadas em repouso por, no mínimo, duas horas. Em seguida, todas as raízes foram colocadas em lâmina de vidro, sobre as quais foram adicionadas gotas de glicerina pura. Outra lâmina de vidro foi sobreposta e, assim, estava pronta para observação no microscópio de objetiva invertida. Quantificou-se o número de J2 que penetrou no sistema radicular aos 4 dias da inoculação e de fêmeas, aos 20 dias da inoculação.

Vinte e oito dias após a inoculação, as plantas foram retiradas jorrando água nas bordas dos tubos. Os sistemas radiculares foram lavados e imersos por 15 minutos em solução de floxina B 0,0015% para coloração das massas de ovos de vermelho. Em seguida, foram colocados sobre papel toalha por 10 minutos para retirar o excesso de água e possibilitar a avaliação do peso fresco das raízes, seguindo da contagem do número de massas de ovos por sistema radicular. Para a avaliação do

número de ovos utilizou-se a técnica de Hussey & Barker (1973) e, em microscópio de objetiva invertida, estimou-se o número de ovos de *M. javanica* por sistema radicular e por grama de raiz.

O número de ovos por sistema radicular foi transformado em raiz de  $x + 0,5$  para a realização da análise de variância.

#### **4.4 Penetração, desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne javanica* em raiz de soja, após a incubação dos juvenis do segundo estágio (J2) em temperaturas fixas e variadas em tempos diferentes.**

Suspensões de J2 de *M. javanica* de uma mesma população foram incubados por 5, 10, 15 ou 20 dias em: a) temperaturas fixas de 5, 10, ou 28° C; b) temperaturas variadas de 5° C por 10 horas seguido de 14 horas em 28° C ou a 10° C por 10 horas seguida de 14 horas em 28° C, e uma testemunha sem incubação. Tubos de ensaio contendo 30 cm<sup>3</sup> de areia fina quartizífera foram previamente autoclavados e umedecidos. Neles foram transplantadas plântulas de soja da cultivar Embrapa 20. Essas plântulas foram inoculadas com uma suspensão de 1 mL contendo 100 J2 de *M. javanica* incubados em diferentes períodos de tempo e de temperatura. A seguir foram mantidos em sala climatizada com temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 x 5, com 4 períodos de armazenamento e 5 tratamentos térmicos mais testemunha adicional de zero dia em cinco repetições.

Aos 4 e 20 dias após a inoculação as plantas foram retiradas dos tubos. Os sistemas radiculares foram lavados. As raízes foram submetidas ao clareamento dos tecidos seguido de coloração dos J2 e fêmeas e preparação de lâminas para observação microscópica. Quantificou-se o número de J2 que

penetrou no sistema radicular aos 4 dias da inoculação e de fêmeas aos 20 dias.

Aos vinte e oito dias após a inoculação, procedeu-se a contagem do número de massas de ovos por sistema radicular, de ovos por sistema radicular e por grama de raiz.

O dados foram transformados em raiz de  $x + 0,5$  para a realização da análise de variância.

A análise de variância assim como as regressões foram realizadas com o programa SAS User'S guide: statistics, version 8 (SAS Intitute Inc., Cary, USA, 1999). As variáveis significativas pelo teste F foram submetidas análise de regressão para ajuste do melhor modelo capaz de descrever o fenômeno biológico em questão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Influência do tempo de incubação no percentual de lipídios de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Na população de J2 de *M. javanica*, o teor de lipídio neutro avaliado pela porcentagem da área colorida do corpo variou de 7,96 a 85,55% (Figura 1). O corante “Oil Red O” coloriu no máximo 85,55% do corpo do J2, encontrado nos recentemente eclodidos. A coloração foi mais intensa na região do intestino, menor na parte anterior do J2 e irregularmente distribuída ao longo do corpo (Figura 1). Esta coloração foi proporcional, decrescente exponencialmente com o aumento do período de incubação. A taxa de perda de lipídio neutro, quando a equação foi linearizada, é de aproximadamente  $-0,17$  / dia (Figura 2). Entretanto, aos 12 dias, a perda de lipídio neutro chegou a 88,65%. Perda de 50,22% do teor de lipídio corporal na população estudada ocorreu aos 3,2 dias de incubação. Aos 2 dias essa perda foi de 38,82% e aos 4 dias de 56,12% (Figura 2).

O corante “Oil Red O” reage com o lipídio neutro produzindo coloração vermelha, conforme demonstrações de Storey (1983) e Christophers *et al.* (1997). No ensaio realizado, as diferentes porcentagens de lipídios, expressas em coloração avermelhada na Figura 1, podem ser usadas como tabela para quantificar o teor de lipídio em J2 empregados como inóculo em pesquisa.

A proporcionalidade da área colorida e o tempo de incubação indicam o envolvimento do lipídio no fornecimento de energia para locomoção e para as funções vitais. Como o corante não coloriu 100% dos J2, possivelmente o lipídio neutro não ocorra em concentração elevada ou inexistente em certas partes do corpo. Entretanto, os órgãos aparentemente sem lipídio podem obter energia através de outras fontes como glicogênio e trealose, como citado por Lee &

Atkinson (1977) e Qiu & Bedding (2000). Contudo, segundo Lee & Atkinson (1977); Storey (1983) e Christophers *et al.* (1997), a fonte principal de energia do J2 no exercício de suas funções vitais e para parasitar o hospedeiro são os lipídios.





85,50	60,75	46,67	24,08	13,70	7,96
-------	-------	-------	-------	-------	------

FIGURA 1. Variações colorimétricas de lipídios neutro, usando-se "Oil Red O", na população de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* empregada nos ensaios, avaliada em porcentagem do corpo do J2 colorido de vermelho.

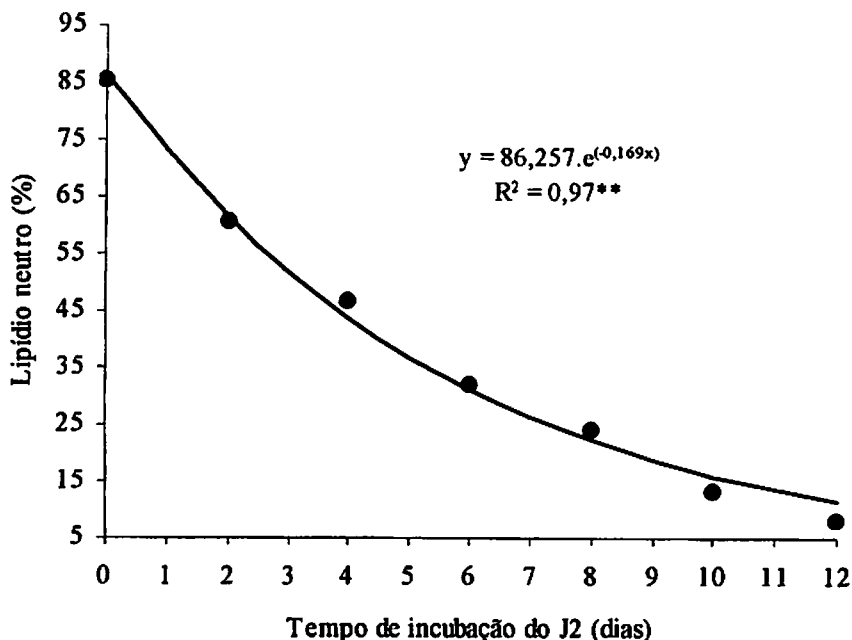


FIGURA 2. Percentual de lipídio neutro avaliado colorimetricamente com “Oil Red O” nos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* submetidos a diferentes períodos de incubação em água parada a 28° C. Pontos na linha seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A queda rápida do teor de lipídio nos primeiros dias de incubação indica intensa atividade muscular do J2, o que constitui, nesta fase, o principal dreno desta energia acumulada, como explicado por Bergeson (1959). O gasto de 50% da reserva lipídica com 3 dias de incubação, aproximadamente, indica, segundo Bergeson (1959), a perda na capacidade parasitária, porém mantendo a atividade motora. Desta forma, a atividade parasitária é perdida antes da motora.

Utilizando “Oil Red O” Christophers *et al.* (1997) encontraram coloração avermelhada em todo o corpo de J2 de *M. incognita* e a consideraram

com potencial máximo para infectividade. De forma semelhante, Storey (1984) utilizou “Oil Red O” para estimar a concentração de lipídio neutro em J2 de *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* em microdensitômetro.

## **5.2. Influência do tempo de incubação em água de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na capacidade de penetração, desenvolvimento e reprodução em raiz de soja.**

A incubação em água dos J2 de *M. javanica* por 2 dias proporcionou redução acentuada e exponencial na penetração de J2, número de fêmeas e de massas de ovos em 45,40%, 73,68% e 60,32%, respectivamente, comparadas com a testemunha em que os J2 não foram incubados (Figura 3). Essa redução continua até o 4º dia de incubação, período em que a penetração foi menor do que aquela aos 2 dias de incubação. A partir daí, a redução foi pequena e houve tendência de estabilização da população de J2, fêmeas e de massa de ovos até aos 12 dias de incubação (Figura 3). A partir dos 2 dias de incubação o número de J2 também foi sempre superior ao número de fêmeas e de massa de ovos até aos 12 dias. Os J2 incubados por 12 dias já tiveram a patogenicidade reduzida em 67,36%, 82,75% e 86,09%, expressas em número de J2, fêmeas e de massas de ovos, respectivamente, comparados com a inoculação dos J2 recentemente eclodidos.

A população total de ovos e de ovos grama de raiz foram significativamente reduzidas pela incubação dos J2 por 2 dias, chegando a 44,64% e 36,63%, respectivamente, em relação à testemunha. Entretanto, a partir dos 2 dias de incubação dos J2 houve tendência de estabilização da população de ovos até aos 12 dias (Figura 4).

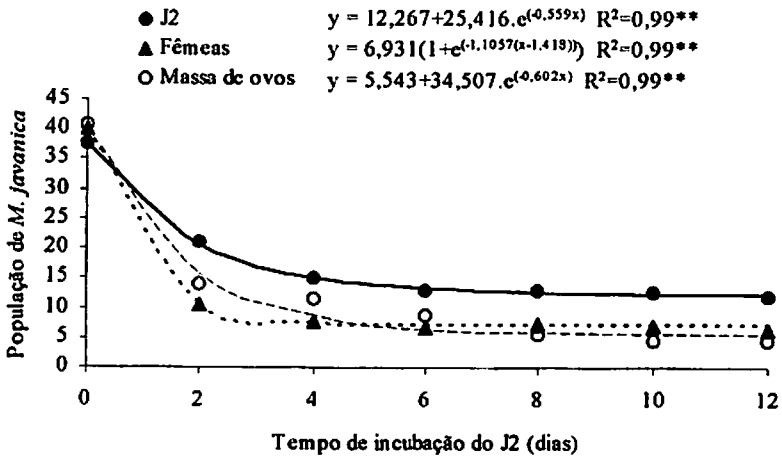


FIGURA 3. Efeito do período de incubação do juvenil do segundo estágio (J2) no número de J2, fêmeas e massa de ovos de *Meloidogyne javanica*.

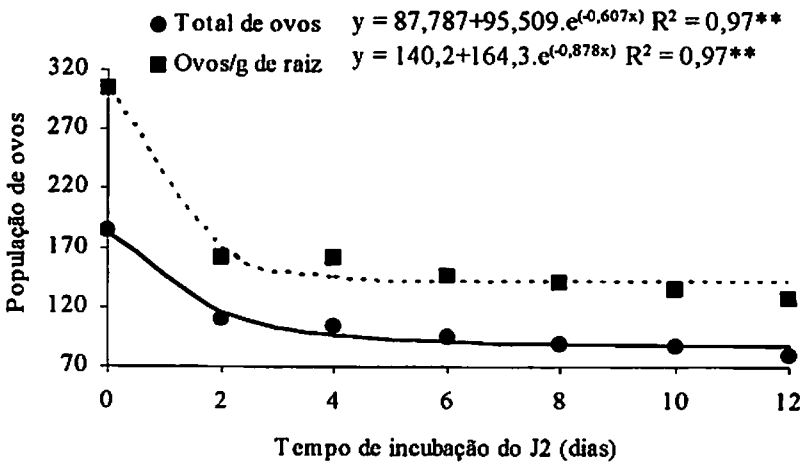


FIGURA 4. Efeito do período de incubação do juvenil do segundo estágio (J2) no total de ovos e ovos por grama de raiz de soja.

A grande redução na penetração, desenvolvimento e reprodução de J2 de *M. javanica* incubados por 2 dias se deve à perda de lipídio durante o período de privação alimentar. De acordo com a avaliação colorimétrica, esta redução deve ter sido de 24,8%. Ainda não se explica a manutenção, apesar de baixa, da patogenicidade até 12 dias de armazenamento, o que deve ocorrer em apenas poucos espécimes da população. Reversat (1981) encontrou 46% de infectividade quando os J2 de *M. javanica* foram incubados por uma semana em meio de fosfato de sódio diluído. Entretanto, com a incubação de J2 de *M. incognita* em água parada por 2 dias a 28° C, Dutra (2002) ainda encontrou 42% de infectividade expressa em galhas por sistema radicular de tomateiro em relação à testemunha e chegou a 0,3% após 6 dias de incubação.

### **5.3. Influência da temperatura na penetração, desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne javanica* em raiz de soja, após a incubação dos juvenis do segundo estágio (J2) em temperaturas fixas e variadas em tempos diferentes.**

Em todos os períodos de incubação dos J2 em temperatura fixa de 5 ou 28° C e variadas de 5° C ou 10° C por 10 horas e seguida de 28° C por 14 horas, proporcionou redução do número de J2 penetrados (Figura 5A e B), número de fêmeas (Figura 6A e B), massa de ovos (7A e B), total de ovos por sistema radicular de soja (8A e B) e de ovos por grama de raiz (Figura 9A e B). Entretanto, a incubação de J2 na temperatura fixa de 10° C não proporcionou redução na penetração de J2 em nenhum período de incubação, ainda nesta temperatura, efeitos menores de redução foram observados para as demais variáveis ao longo do período de incubação. No entanto, as reduções foram maiores em temperatura de 5° C (Figuras 5A, 6A, 7A, 8A e 9A). Efeito semelhante, porém menor, também foi observado com a temperatura fixa de 28°

C em todas as variáveis avaliadas. O comportamento na redução do número de todas as variáveis nas temperaturas variadas de 5 ou 10° C por 10 horas seguido de 28° C por 14 horas foi semelhante ao longo do período de incubação dos J2.

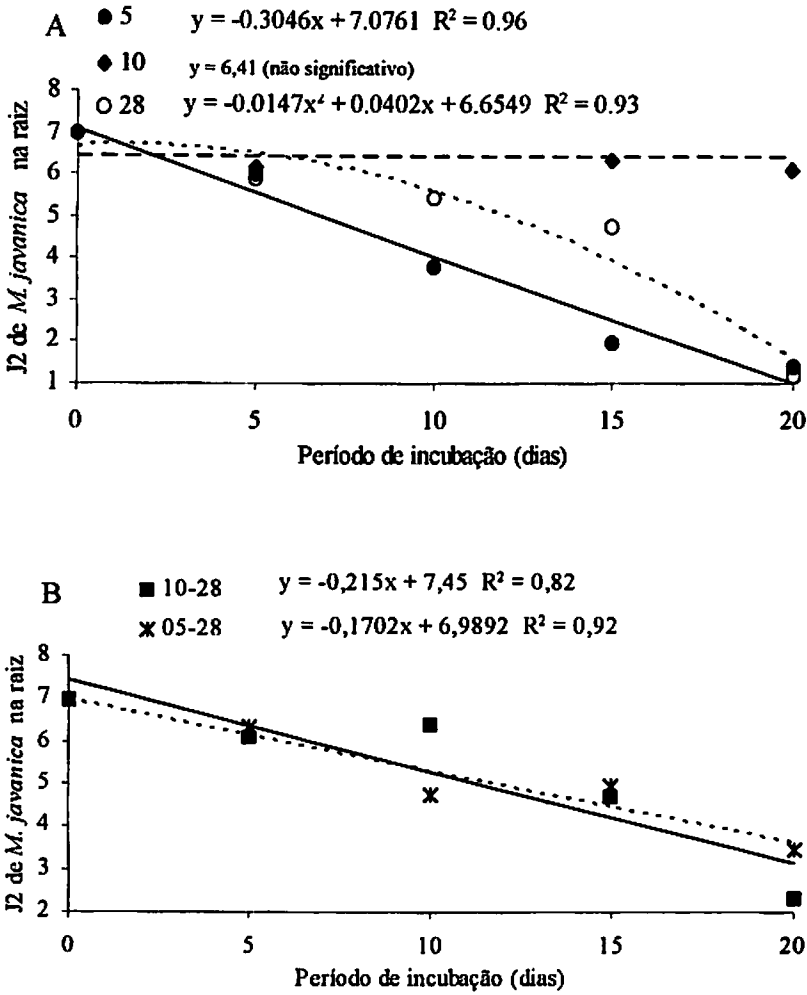


FIGURA 5. Efeito da incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em temperaturas (fixas e variadas) por diferentes períodos de tempo no número de J2 penetrados em raízes de soja. A) temperaturas fixas de 5, 10 ou 28° C, e B) temperaturas variadas por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C ou 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C.

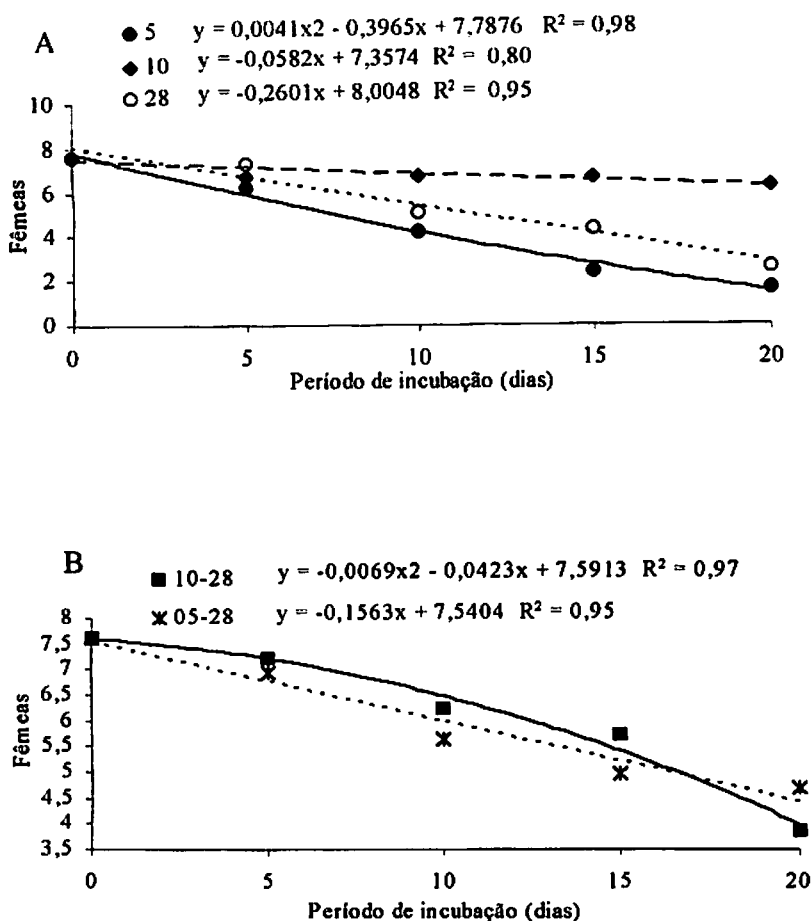


FIGURA 6. Efeito da incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em temperaturas (fixas e variadas) por diferentes períodos de tempo no número de fêmeas em raízes de soja. A) temperaturas fixas de 5, 10 ou 28° C, e B) temperaturas variadas por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C ou 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C.

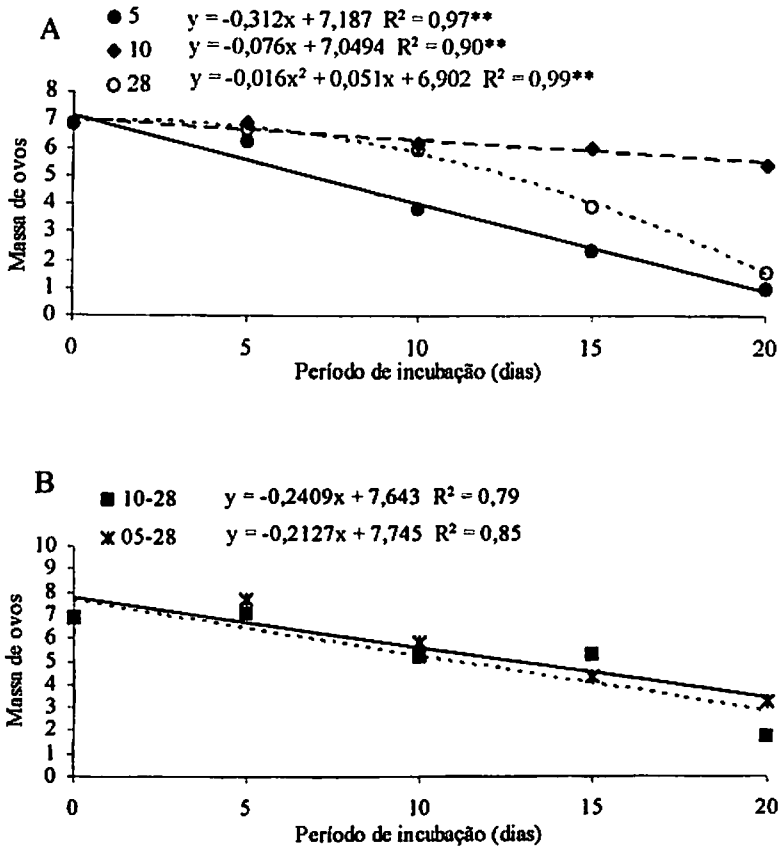


FIGURA 7. Efeito da incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em temperaturas (fixas e variadas) por diferentes períodos de tempo no número de massa de ovos em raízes de soja. A) temperaturas fixas de 5, 10 ou 28° C, e B) temperaturas variadas por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C ou 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C.



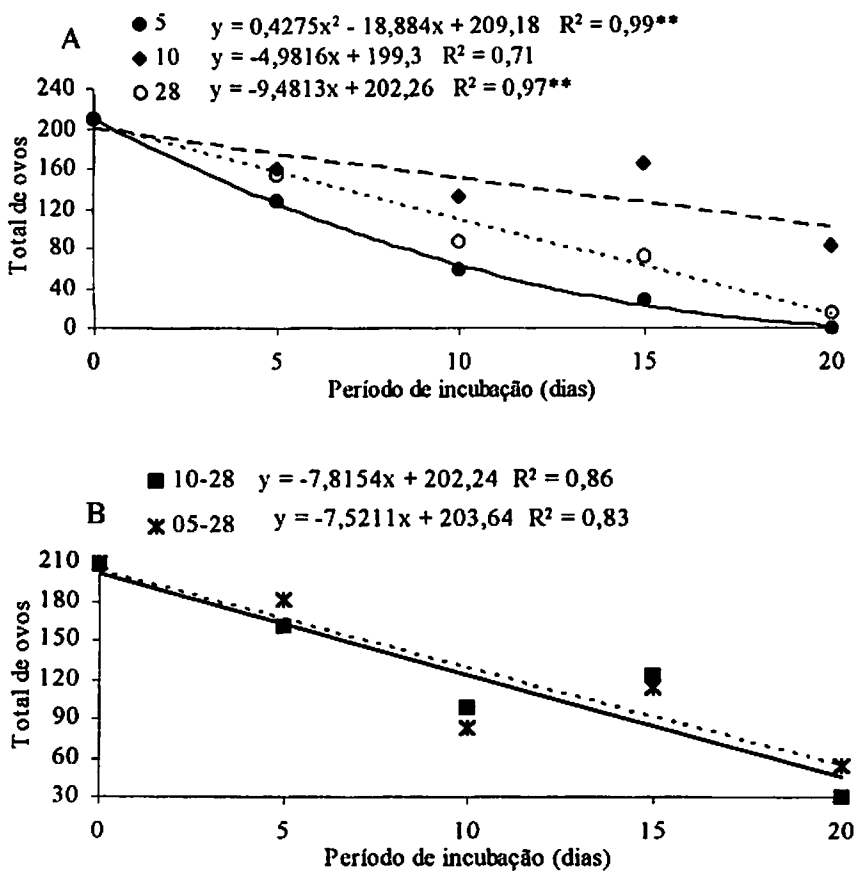


FIGURA 8. Efeito da incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em temperaturas (fixas e variadas) por diferentes períodos de tempo no número total de ovos por sistema radicular de soja. A) temperaturas fixas de 5, 10 ou 28° C, e B) temperaturas variadas por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C ou 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C.

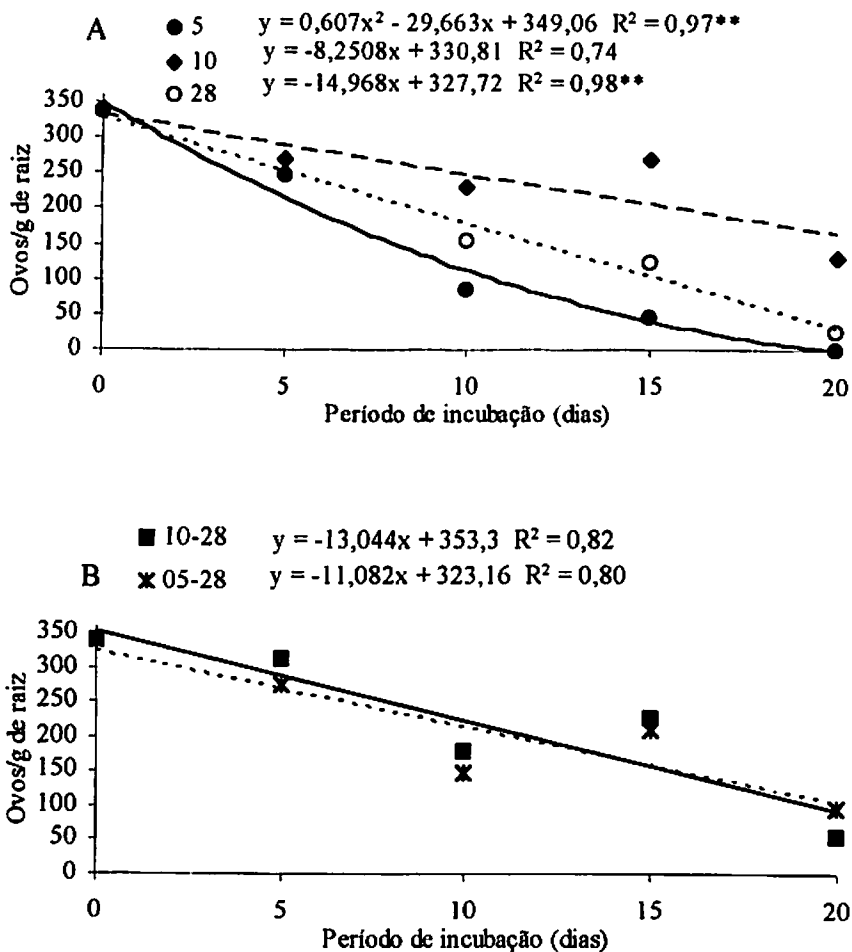


FIGURA 9. Efeito da incubação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em temperaturas (fixas e variadas) por diferentes períodos de tempo no número de ovos por grama de raiz de soja. A) temperaturas fixas de 5, 10 ou 28° C, e B) temperaturas variadas por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C ou 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C.

Valores semelhantes do número de J2 penetrados em raízes de soja após sofrer a incubação por 5 dias em água com diferentes temperaturas, indica que o efeito térmico não alterou sua capacidade de penetração. Contudo afetou detrimentalmente a reprodução quando os J2 foram armazenados a 5° C. Desta forma, o processo injurioso da temperatura de 5° C já se iniciou mesmo neste período de incubação. Portanto, a injúria pelo frio pode afetar antes a reprodução do que o movimento do J2. A incubação a 10° C preserva a energia corporal. Segundo Bergeson (1959), a 10° C o J2 se movimenta pouco economizando energia corporal, porém seus órgãos não sofrem injúrias capazes de provocar disfunções vitais.

A formação de três grupos nos tratamentos com temperatura de 5, 10 e 28° C a partir dos 10 dias de incubação envolve processos diferentes. Portanto, a 5° C, a perda de patogenicidade ocorre pela injúria nos tecidos, levando à morte do juvenil infectivo. Segundo Bergeson (1959), a taxa de sobrevivência de J2 de *M. incognita* expressa em número de galhas por tomateiro chegou a zero quando expostos a 4,5° C por mais de 7 dias. Assim, Bergeson concluiu que as temperaturas de 0 e 4,5° C foram letais aos J2 de *M. incognita* quando esses foram expostos por 7 e 14 dias, respectivamente. Thomason *et al* (1964) observaram que mais de 70% dos J2 de *M. javanica* perderam a mobilidade após 4 dias de estocagem em temperatura de 3° C, e foi obtida a mesma proporção na redução de infectividade em plantas de tomates utilizando os mesmos J2. Van Gundy (1985) relatou que as espécies *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e possivelmente, *M. exigua* não sobrevivem por maiores períodos em temperaturas abaixo de 10° C. Em temperaturas de 27 ou 28° C, a diminuição da mobilidade e infectividade dos J2 de *M. javanica* ocorre mais rápido em função da sua alta taxa de respiração por estarem muito ativos e, por conseguinte, alto consumo da fonte de energia corporal requerida para penetração e estabelecimento do sítio de alimentação (Thomason *et al.*, 1964; Van Gundy *et al.*, 1967). Segundo Van

Gundy *et al.* (1967), a redução significativa da capacidade infectiva de J2 de *M. javanica* ocorreu quando 50% das reservas energéticas foram perdidas devido a sua alta movimentação antes do contato com o hospedeiro.

De acordo com Dutra (2002), a porcentagem de imobilização dos J2 de *M. incognita* aumentou no período de 2 a 6 dias de privação alimentar em temperatura de 8 a 28° C, porém foi inversamente proporcional à infectividade desse inóculo.

A patogenicidade do J2 parece ser mais afetada pela injúria do frio a 5° C do que pela escassez de energia do J2 em temperatura de 28° C por 2 dias de incubação, apesar das duas condições de temperatura serem altamente detrimenais ao J2.

O período de incubação dos J2 em temperaturas de 5 ou 10° C e o retorno a 28° C parece não ter influenciado a patogenicidade do J2 comportando-se ao mesmo nível da incubação em temperatura fixa de 28° C. Desta forma, o período de incubação nas temperaturas alternadas deve ser aumentado para diferenciá-los daquela de temperatura fixa a 28° C. Segundo Van Gundy (1985), o tempo de pré-tratamento em baixas temperaturas pode ser também um fator importante para a adaptação do nematóide ao resfriamento, sendo que a suscetibilidade do J2 de *Meloidogyne* à morte sob temperaturas baixas está relacionada com a fase de transição e posição de lipídios na hipoderme do nematóide.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) A incubação do J2 de *M. javanica* ao longo do tempo em água reduziu o teor de lipídio no seu corpo de forma exponencial bem como a penetração, o desenvolvimento e a reprodução.
- 2) A temperatura de incubação de 5° C causou injúria e morte do J2 e a de 10° C mantém sua energia corporal.
- 3) A redução do número de J2 penetrados, de fêmeas, massas de ovos, total de ovos e ovos por grama de raiz foi acentuada em cada período com temperatura fixa de 5 e 28° C.
- 4) As temperaturas alternadas nos períodos utilizados afetaram o número de J2, de fêmeas e a reprodução.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. 4<sup>th</sup>ed. San Diego: Academic, 1997. 635 p.
- BERGESON, G.B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. *Nematologica*, v. 4, p. 344-354, 1959.
- BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T. JR.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, DeLeon Springs, v. 15, n. 1, p. 142-143, Dec. 1983.
- CAMPOS, V.P. et al. Manejo de nematóides em hortaliças. In: SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. *Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças*. Lavras: UFLA, 2001. p.125-158.
- CHRISTOPHERS, A.E.P. et al. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. *Nematologica*, v. 43, p. 117-120, 1997.
- DUTRA, M.R. *Manejo do solo e da água no controle de nematóides de galhas (*Meloidogyne* sp.) e estudos "in vitro" da temperatura e umidade na infectividade desses patógenos*. 2002. 131p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ENDO, B.Y. Histopathology and ultrastructure of crops invaded by certain sedentary endoparasitic nematodes. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D.W. (Ed.). *Vistas on nematology*. Hyattsville, MD: Society of Nematologists, 1987. p.196-210.
- FAN, X.; HOMINICK, W.M. Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two *Steinernema* species (Nematoda: Steinernematidae). *Revue de Nématologie*, v.14, n.3, p.407-412, 1991.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report*, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1128, 1973.
- LEE, D.L. ATKINSON, H.J. *Physiology of nematodes*. New York: Columbia University, 1977. 215p.

QIU, L.; BEDDING, R.A. Energy metabolism and survival of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under oxygen-deficient conditions. **Journal of Nematology**, v.32, n.3, p.271-280, 2000.

REVERSAT, G. Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions inducing osmobirosis. **Nematologica**, v.27, p. 207-214, 1981.

STOREY, R.M.J. The initial neutral lipid reserves of juveniles of *Globodera* spp. **Nematologica**, v. 29, p. 144-150, 1983.

STOREY, R.M.J. The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* spp. **Annual Applied Biology**, v. 104, p. 511-520, 1984.

THOMASON, I.J.; VAN GUNDY, S.D.; KIRKPATRICK, J.D. Motility and infectivity of *Meloidogyne javanica* as affected by storage time and temperature in water. **Phytopathology**, v. 54, p. 192-195, Feb. 1964.

VAN GUNDY, S.D. Ecology of *Meloidogyne* spp.- emphases on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Raleigh, North Carolina. 1985, v.1, p.177-182.

VAN GUNDY, S.D.; BIRD, A.F.; WALLACE, H.R. Ageing and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, v.57, p. 559-571, 1967.

## **CAPÍTULO 7**

**Efeito da temperatura do solo no desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em cultivares resistentes e suscetíveis de soja.**



## 1 RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Efeito da temperatura do solo no desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em cultivares resistentes e suscetíveis de soja. In: \_\_\_\_\_. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. 2003. Cap. 7. p. 146-166. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Objetivou-se, neste trabalho, estudar o efeito de temperaturas fixas do solo no desenvolvimento e na reprodutividade de *M. javanica* e de *H. glycines* raça 3, bem como a demanda de graus-dia para completar o seu desenvolvimento em cultivares resistente e suscetível de soja. Quando a temperatura do solo foi mantida a 28° C ocorreram melhores desenvolvimento e reprodução em qualquer cultivar, e os piores a 20° C. Na temperatura de 28° C, a reprodução e o sucesso no parasitismo de *M. javanica* nas cultivares resistentes MGBR-46 e BRSMG Garantia foram semelhantes aos da suscetível Embrapa 20. De modo geral, o parasitismo de *H. glycines* foi favorecido no intervalo de temperatura de 24 a 28° C, mas a temperatura não afetou a resistência da cultivar BRSMG Liderança a *H. glycines* raça 3. Para *M. javanica*, o requerimento térmico foi de 425,76 graus- dia para completar o seu desenvolvimento após a penetração do J2, para *H. glycines*, foi de 452,64 a 545,76 graus-dia, em soja.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Effect of soil temperature on post-embryonic development and reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines* in resistant and susceptible soybean cultivars. In: \_\_\_\_\_. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. Cap. 7. p. 146-166. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

This work aimed to study the effect of fixed temperatures of the soil on post-embryonic development and on reproduction of *M. javanica* and *H. glycines* race 3, as well as the temperature requirement to complete its development in resistant and susceptible soybean cultivars. When the soil temperature was kept at 28° C occurred better post-embryonic development and greater reproduction in any cultivar, and the worst at 20° C. At 28° C the reproduction and the parasitism success of *M. javanica* in resistant cultivars MGBR-46 and BRSMG Garantia were similar to the susceptible Embrapa 20. In general, the parasitism of *H. glycines* was good from 24 to 28° C. To *M. javanica* the temperature requirement was of 425,76 degrees-day to complete its development after penetration of J2 and to *H. glycines* it was 452,64 to 545,76 degrees-day, in soybean.

---

\* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

Cultivares de soja com resistência constituem método de fácil adoção no controle de nematóides do gênero *Meloidogyne*. No Brasil, a soja é cultivada em diversas regiões, apresentando condições ambientais diversificadas, principalmente quando se trata do fator temperatura, o qual proporciona maior interferência no desenvolvimento do nematóide dentro do hospedeiro. Em temperaturas altas do solo geralmente os nematóides apresentam alta atividade. No entanto, estudos com a cultura do tomateiro (Araújo *et al.*, 1982; Haroon *et al.*, 1993; Alves & Campos 2001), do feijoeiro (Omwega *et al.*, 1990), alface e pimentão (Alves & Campos, 2001) já evidenciaram menor resistência de cultivares ou maior reprodução de *Meloidogyne* em temperaturas do solo acima de 28° C.

A adaptação do nematóide de cisto da soja *Heterodera glycines* aos novos e diferentes ambientes tem sido causa de reavaliação de recomendações de controle cultural, embora o emprego de cultivares resistentes, aliado a outras estratégias de controle constituam caminho eficiente no seu controle. Segundo Niblack (1999), nos países onde já se conseguiram avanços no melhoramento de cultivares, o *H. glycines* ainda é um sério problema, principalmente em função da sua elevada variabilidade intra-específica, pois apresenta um grande número de raças fisiológicas aumentando a sua capacidade de se adaptar em diferentes ambientes e as novas cultivares lançadas. De acordo com Anand *et al.* (1995), temperatura, raça, genótipo do hospedeiro e a interação entre eles são fatores significantes e importantes na reprodução de *H. glycines* em soja. Ainda não se conhece bem a reação entre genótipos de soja resistentes ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e de *H. glycines* e a temperatura do solo. Assim, objetivou-se, nesse trabalho, estudar o efeito de temperaturas fixas do solo no

desenvolvimento e na reprodutividade de *M. javanica* e de *H. glycines* raça 3, bem como a demanda de graus-dia para completar o seu desenvolvimento em cultivares resistentes e suscetíveis de soja.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines*

Os juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* e de *H. glycines* foram obtidos conforme descrito no capítulo 2, em 4.1.

### 4.2 Penetração e desenvolvimento de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* ou de *Heterodera glycines* raça 3 em raiz de soja suscetível e resistente crescidas em diferentes temperaturas no solo.

Sementes de soja da cultivar Embrapa-20 (suscetível a *M. javanica* e *H. glycines*), MGBR-46 (Conquista) e BRSMG Garantia (resistentes a *M. javanica*) e BRSMG Liderança (resistente a *H. glycines* raça 3) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto e colocadas para germinar em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ . Após 3 dias da semeadura, as sementes germinadas com radícula de 2 cm foram transferidas para os tubos de ensaio contendo  $50 \text{ cm}^3$  da mistura de solo e areia grossa (2:1) desinfestada com brometo de metila na dosagem de  $150 \text{ cm}^3/\text{m}^3$  da mistura, e previamente umedecida. Quarenta e oito horas após, infestou-se o substrato de cada tubo com 100 J2 de *M. javanica* ou de *H. glycines* e, em seguida, foram mantidos em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Aos 4 dias após a inoculação, 6 plantas de cada cultivar foram utilizadas para avaliar a penetração de J2 no sistema radicular. Os demais tubos com plantas foram colocados em recipientes de aço inoxidável, de  $1200 \text{ cm}^3$  e ao redor foi adicionado areia grossa previamente umedecida. Em seguida, o conjunto foi colocado em banho-maria próprio para aquecer vasos (Alves & Campos, 2001) e instalados em sala climatizada. Desta forma, a areia nos

recipientes e a mistura de solo e areia no interior dos tubos de ensaio foram aquecidos. As temperaturas utilizadas nos banhos-maria foram 20, 24, 28 e  $32 \pm 0,3^\circ$  C. Nos banhos-maria foram colocados sensores imersos na areia contida nos recipientes de aço inoxidável com as plantas e outro suspenso a 0,5 m acima deles para registrar a temperatura e umidade interna e externa dos recipientes. Os sensores foram conectados a cabos e estes, a “dataloggers”, que registraram os dados a cada 60 minutos. Em seguida, esses dados foram descarregados em computador por meio do programa Pclink 4p.

Foi empregado o delineamento estatístico inteiramente casualizado em fatorial  $3 \times 4$  para o ensaio com *M. javanica*, com 3 cultivares e 4 temperaturas, e fatorial  $2 \times 4$  para o ensaio com *H. glycines*, com 2 cultivares e 4 temperaturas, em 6 repetições.

Aos 4 dias após a inoculação, isto é, antes das plantas serem transferidas para o banho-maria e aos 20 dias após a inoculação de cada tratamento, as plantas foram retiradas jorrando água nas bordas dos tubos. Os sistemas radiculares foram lavados sobre peneira de 0,075 mm, para que não houvesse perda de raiz ou fêmeas no caso de *H. glycines*. Em seguida, as raízes foram submetidas ao clareamento dos tecidos em hipoclorito de sódio a 1,5% por 6 minutos para aquelas com 4 dias após a inoculação, e de 10 minutos para aquelas com 20 dias de inoculadas. As raízes foram enxaguadas em água corrente para eliminar todo o resíduo de hipoclorito de sódio. Foram transferidas para tubo de vidro e adicionada uma solução corante diluída até cobri-las, preparada com 3,5 gramas de fucsina ácida + 250 mL de ácido láctico + 750 mL de água destilada (adaptado de Byrd *et al.*, 1983) e diluída 1: 29 (1 mL de solução corante inicial + 29 mL de água destilada). Em seguida, foram imersas no corante e mantidas por 2 minutos em banho-maria com a água em ebulição. O resfriamento total foi feito em condições ambiente durante a noite. As raízes foram, então, lavadas para eliminar o excesso de corante e recolocadas nos

tubos, cobertas com solução de glicerina 1:1 (glicerina pura + água destilada) e deixadas em repouso por no mínimo duas horas. Todas as raízes foram colocadas em lâmina de vidro, sobre as quais foram colocadas gotas de glicerina pura. Outra lâmina de vidro foi sobreposta e, assim, estava pronta para observação no microscópio de objetiva invertida. Quantificou-se, aos 4 dias da inoculação, o número de J2 penetrados no sistema radicular. Aos 20 dias quantificou-se o número de juvenis do terceiro mais o quarto estádios (J3 + J4), de fêmeas por sistema radicular e o percentual de sucesso no parasitismo, dividindo o número de fêmeas pelo número de J2 penetrados X 100, para *M. javanica* e *H. glycines*.

#### **4.3 Reprodução de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines* raça 3 em raiz de soja suscetível e resistente crescidas em diferentes temperaturas no solo.**

Plântulas de soja de cultivar suscetível e resistentes foram cultivadas em tubos de ensaio contendo solo e areia grossa em mistura e inoculadas com *M. javanica* e *H. glycines*, como já descrito. Empregaram-se os mesmos tratamentos e delineamento experimental.

Aos 28 dias da inoculação, as plantas desenvolvidas nas mesmas condições descritas anteriormente, e infestadas com *M. javanica*, foram retiradas dos tubos jorrando água em seus bordos. Os sistemas radiculares foram lavados e imersos por 15 minutos em uma solução de floxina B 0,0015% para coloração das massas de ovos de vermelho. Em seguida, o sistema radicular foi colocado sobre papel toalha por 10 minutos para retirar o excesso de água e possibilitar a avaliação do peso fresco das raízes, seguido da contagem do número de massas de ovos por sistema radicular. Para a avaliação do número de ovos utilizou-se a técnica de Hussey & Barker (1973). Em microscópio de objetiva invertida

estimou-se o número de ovos de *M. javanica* por sistema radicular (total) e a capacidade reprodutiva por fêmea, cujo valor foi obtido dividindo o número de ovos por sistema radicular pelo número de fêmeas por sistema radicular.

Nas cultivares infestadas com *H. glycines*, o substrato e o sistema radicular da planta de cada unidade experimental, foram retirados dos tubos cuidadosamente sobre peneira de 0,85 mm sobreposta a outra de 0,18 mm, e lavados sob jato de água. Em seguida, o sistema radicular inteiro e o material retido na peneira de 0,18 mm foram recolhidos e analisados em lupa. Quantificaram-se o número de fêmeas e cistos por planta.

Na análise de variância utilizou-se o programa Sisvar. Os dados relativos ao número de J3 + J4 e número de massas de ovos de *M. javanica* foram transformados em raiz de  $x + 0,5$  para a realização da análise de variância. Na comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.4 Acúmulo de graus-dia para o desenvolvimento de *M. javanica* e de *H. glycines*.**

Para o cálculo dos graus-dia a partir da penetração dos J2 nas plantas, tomou-se como base a equação utilizada por Tyler (1933), que estimou o limiar de desenvolvimento para *Meloidogyne* spp. em 10° C. A equação mencionada foi  $K = y (t - T_b)$ , em que  $K$  = constante térmica expressa em graus-dia;  $y$  = número de dias para o desenvolvimento pós-penetração do J2 do nematóide, que foi de 24 dias;  $t$  = temperatura média do substrato no aquecedor tipo banho-maria;  $T_b$  = temperatura base (10° C). Para *H. glycines* foi utilizado 5° C como temperatura base, conforme sugerido por Alston & Schmitt (1988) e Schneider *et al.* (1989),  $y = 24$  dias.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da temperatura do solo no desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne javanica* em raiz de soja suscetível e resistente.

O efeito global das temperaturas no número de fêmeas, massas de ovos, total de ovos e sucesso do parasitismo foi maior ( $P \leq 0,05$ ) a 28° C e menor ( $P \leq 0,05$ ) a 20° C (Tabela 1 e 2).

O número de J2 de *M. javanica* penetrados por sistema radicular aos 4 dias após a inoculação a 27±2° C, ou seja, antes das plantas serem transferidas para o banho-maria, foi maior ( $P \leq 0,05$ ) na cultivar suscetível, em cerca de 24% daquele na resistente (Tabela 1).

A soma de J3 e J4 aos 20 dias após a inoculação foi maior ( $P \leq 0,05$ ) tanto no suscetível como nas resistentes a 20° C quando comparadas com as demais temperaturas testadas. Na cultivar suscetível a incubação nas demais temperaturas proporcionou valores semelhantes ( $P \leq 0,05$ ) de J3 + J4, porém nas resistentes, a 28° C ele foi o mais baixo ( $P \leq 0,05$ ) dentre as temperaturas testadas (Tabela 1). A 28° C foi maior ( $P \leq 0,05$ ) o número de fêmeas e massas de ovos em todos as cultivares testadas do que em qualquer outra temperatura. A 20° C foi menor ( $P \leq 0,05$ ) o número de fêmeas e massas de ovos na cultivar suscetível do que em qualquer outra temperatura, porém nas resistentes o número de fêmeas e de massas de ovos não diferiram daquele a 24° C. Nas temperaturas de 24 e 32° C foram semelhantes ( $P \leq 0,05$ ) o número de fêmeas e de massas de ovos em qualquer cultivar testada.

O total de ovos de *M. javanica* foi maior ( $P \leq 0,05$ ) na temperatura de 28° C e semelhante nas demais nas cultivares resistentes. Já na suscetível o total de ovos foi semelhante e maior ( $P \leq 0,05$ ) a 28 e 32° C do que as demais, e mais

baixo ( $P \leq 0,05$ ) a  $20^\circ \text{C}$ . O sucesso no parasitismo foi mais elevado ( $P \leq 0,05$ ) a  $28^\circ \text{C}$  em qualquer cultivar. Na cultivar suscetível, a capacidade reprodutiva por fêmea foi maior a  $32^\circ \text{C}$  (Tabela 2).

De modo geral, o cultivar Embrapa 20 em todos as variáveis avaliadas em relação a *M. javanica*, obteve maiores valores ( $P \leq 0,05$ ) do que a MGBR-46 e BRSMG Garantia, os quais foram significativamente semelhantes entre si (Tabela 3).

TABELA 1- Número de juvenis do segundo (J2), terceiro (J3) e quarto (J4) estádios, fêmeas e massa de ovos de *Meloidogyne javanica* em raiz de soja resistente (MGBR-46 e BRSMG Garantia) e suscetível (Embrapa 20) crescidas em diferentes temperaturas do solo.

Cultivar	Número de J2 penetrados	Temperatura (° C)	Soma de J3 + J4	Número de fêmeas	Massas de ovos
Embrapa 20	34,17 a	32	2,83 b	28,67 b	19,83 b
		28	4,17 b	50,33 a	40,17 a
		24	5,00 b	26,83 b	21,33 b
		20	37,17 a	7,00 c	7,17 c
MGBR-46	26,33 b	32	4,33 b	11,67 b	12,00 b
		28	0,17 c	41,00 a	24,33 a
		24	4,00 b	15,33 b	6,83 b c
		20	31,83 a	10,17 b	2,50 c
BRSMG Garantia	25,50 b	32	3,33 c	16,33 b	6,50 b
		28	0,00 d	49,33 a	21,67 a
		24	14,17 b	9,17 b c	6,83 b
		20	27,33 a	2,00 c	3,00 b
CV %	22,89		19,26	35,85	19,90

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra para cada cultivar não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 2- Número total de ovos, percentual do sucesso de parasitismo e capacidade reprodutiva por fêmea de *Meloidogyne javanica* em cultivares de soja suscetível (Embrapa 20) e resistentes (MGBR-46 e BRSMG Garantia) crescidas em diferentes temperaturas do solo.

Cultivar	Temperatura (° C)	Total de ovos	Sucesso no parasitismo (%)	Capacidade reprodutiva / fêmea
Embrapa 20	32	16033,54 a	80,44 b	572,71 a
	28	17566,32 a	147,70 a	352,41 b
	24	9631,09 b	80,59 b	360,36 b
	20	1802,86 c	21,49 c	245,08 b
MGBR-46	32	3487,94 b	46,83 b	380,50 a
	28	8111,50 a	157,45 a	214,54 a b
	24	3064,35 b	59,96 b	197,14 b c
	20	380,39 b	40,03 b	38,71 c
BRSMG Garantia	32	3053,86 b	65,87 b	191,77 a
	28	14222,09 a	194,57 a	302,42 a
	24	2474,25 b	36,26 b c	272,06 a
	20	219,35 b	7,72 c	11,42 b
CV %		38,01	30,79	42,00

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra para cada cultivar não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 3- Valor global do número de juvenis do segundo (J2), terceiro (J3) e quarto (J4) estádios, fêmeas, massa de ovos, total de ovos, sucesso no parasitismo e capacidade reprodutiva por fêmea de *Meloidogyne javanica* em cultivares de soja.

Cultivar	Número de J2	Número de J3 + J4	Fêmeas	Massas de ovos	Total de ovos	Suc. paras.(%)	Capac reprod
Embrapa 20	34,17 a	12,29 a	28,21 a	22,12 a	11258,45 a	82,55 a	382,64 a
MGBR-46	26,33 b	10,08 b	19,54 b	11,42 b	3761,04 b	76,07 a	207,72 b
BRSMG Garantia	25,50 b	11,21 a b	19,21 b	9,50 b	4992,39 b	76,10 a	194,41 b
CV %	22,89	19,26	35,85	19,90	38,01	30,79	42,00

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A penetração de J2 de *M. javanica* nas cultivares resistentes MGBR-46 e BRSMG Garantia em proporções próximas aquelas na suscetível indicam que a resistência ocorre pós-penetração e é reduzida a 28° C, propiciando alta reprodução de *M. javanica*. Outro indicativo da reversão desta resistência em suscetibilidade pode ser constatado pelo alto número de fêmeas na temperatura de 28° C, o que indica que as cultivares propiciaram condições nutricionais para elevado número de J2 completar o desenvolvimento pós embrionar bem próximo dos valores na suscetível. Esta temperatura parece também afetar a velocidade do desenvolvimento pós embrionar desse nematóide já que a soma de J3 e J4 foi baixa ou nula quando se avaliou aos 20 dias após a inoculação, indicando que neste período o nematóide já estava no estágio adulto. Por conseguinte, deve ocorrer efeito da temperatura de 28° C na cultivar resistente afetando o mecanismo de resistência, e no juvenil acelerando o seu processo fisiológico. Contudo, esse efeito não se manifestou a 32° C como ocorrido em tomateiro com gene *Mi* inoculado com *M. javanica* e mantidos em temperatura de 29,1 e 32° C (Inomoto *et al.*, 1995). Segundo Dropkin (1969), a resistência a *Meloidogyne* conferida pelo gene *Mi* em tomateiro é reduzida em temperaturas a partir de 28° C. A redução da resistência de tomateiro, pimentão e alface a *M. javanica* e/ou a *M. incognita* também foi observada por Alves & Campos (2001) quando as plantas foram mantidas em sala climatizada com temperaturas do solo de 29,3°C.

## **5.2 Efeito da temperatura do solo no desenvolvimento e reprodução de *Heterodera glycines* raça 3 em raiz de soja suscetível e resistente.**

Quando se analisou este efeito em cada cultivar a resposta foi diferente. Na suscetível ocorreu maior ( $P \leq 0,05$ ) número de fêmeas, total de fêmeas + cistos e sucesso no parasitismo a 28° C do que em qualquer outra temperatura, seguida daquele a 24° C (Tabela 4). Nas temperaturas de 20 e 32° C o número de

fêmeas, total de fêmeas + cistos e o sucesso no parasitismo foram semelhantes e os mais baixos ( $P \leq 0,05$ ). O número de J3 + J4 foi maior ( $P \leq 0,05$ ) a 20° C seguido daquele a 28° C e semelhante ( $P \leq 0,05$ ) nas temperaturas de 24° C e 32° C (Tabela 4).

TABELA 4- Número de juvenis do segundo (J2), terceiro (J3) e quarto (J4) estádios, fêmeas dentro da raiz e fêmeas e cistos fora da raiz de *Heterodera glycines* em cultivares resistente (BRSMG Liderança) e suscetível (Embrapa 20) de soja crescidas em diferentes temperaturas do solo.

Cultivar	Número de J2 penetrados	Temperatura (° C)	Número de J3 + J4	Número de fêmeas	Total de fêmeas + cistos	Sucesso no parasitismo (%)
Embrapa 20	46,50 b	32	11,33 c	5,67 c	6,67 c	12,27 c
		28	28,00 b	28,17 a	21,33 a	60,04 a
		24	7,67 c	16,50 b	13,83 b	35,56 b
		20	38,67 a	3,00 c	3,67 c	6,39 c
BRSMG Liderança	52,33 a	32	17,67 a	5,17 b	4,83 a	10,00 b
		28	8,67 a b	4,83 b	3,83 a	9,49 b
		24	4,83 b	14,33 a	5,83 a	28,74 a
		20	11,00 a b	4,33 b	1,83 a	8,11 b
CV %	19,52		42,44	29,35	41,02	25,48

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra para cada cultivar não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na cultivar resistente, o total de fêmeas + cistos foi baixo e semelhante ( $P \leq 0,05$ ) em qualquer temperatura. Já o número de fêmeas e o sucesso no parasitismo foi maior a 24° C e semelhante ( $P \leq 0,05$ ) entre todos os demais (Tabela 4). Embora a penetração de J2 tenha sido maior ( $P \leq 0,05$ ) na cultivar BRSMG Liderança, o número de J3 + J4, de fêmeas, total de fêmeas + cistos e o sucesso no parasitismo foram maiores ( $P \leq 0,05$ ) na cultivar Embrapa 20 (Tabela 5).

TABELA 5- Número de juvenis do segundo (J2), terceiro (J3) e quarto (J4) estádios, fêmeas dentro da raiz e fêmeas e cistos fora da raiz de *Heterodera glycines* em cultivares resistente (BRSMG Liderança) e suscetível (Embrapa 20) de soja.

Cultivar	Número de J2	Número de J3 + J4	Número de fêmeas	Total de fêmeas + cistos	Sucesso no parasitismo (%)
Embrapa 20	46,50 b	21,42	13,33 a	11,37 a	28,57 a
BRSMG Liderança	52,33 a	10,54	7,17 b	4,08 b	14,09 b
CV%	19,52	42,44	29,35	41,02	25,48

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A temperatura não afetou a resistência da cultivar BRSMG Liderança a *H. glycines* raça 3. Entretanto, o parasitismo de *H. glycines* nas cultivares testadas foi favorecido pelo intervalo de temperatura de 24 a 28° C. Em linhagem de feijociro Mizobutsi *et al.* (2001), encontraram suscetibilidade a *H. glycines* raça 3 em temperatura de 30° C. Em cultivar suscetível, Alston & Schmitt (1988) observaram maior desenvolvimento de *H. glycines* em temperaturas variando de 22 a 29° C.

A resistência da cultivar não desfavorece a penetração de J2 nas raízes, porém vai tornar-se obstáculo para o seu desenvolvimento e reprodução. Assim como foi observado para *M. javanica*, a resistência de soja a *H. glycines* também ocorre na fase pós-penetração. Segundo Kim & Riggs (1992), os J2 de *H. glycines* são eficazes na penetração em raízes de cultivares resistentes de soja, como Peking, Forrest e Bedford, porém não formam o sítio de alimentação tendo o seu desenvolvimento interrompido.



### 5.3 Acúmulo de graus-dia para o desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* e de *Heterodera glycines*.

O acúmulo de graus-dia aumentou quando foram empregadas temperaturas mais altas tanto para *M. javanica* como para *H. glycines*. Vinte e oito graus centígrados foi a melhor temperatura para desenvolvimento e reprodução de *M. javanica* nas cultivares de soja testadas, exigindo requerimento térmico acumulado de 425,76 graus-dia. Já *H. glycines* teve o seu parasitismo favorecido no intervalo de 24 a 28° C, e o requerimento térmico acumulado neste intervalo foi de 452,64 a 545,76 graus-dia, respectivamente. Portanto, o requerimento térmico para *H. glycines* foi maior do que para *M. javanica*, apesar da temperatura base utilizada ter sido de 5° C para *H. glycines* e de 10° C para *M. javanica*. Alves & Campos (2001), utilizando temperatura de 29,3° C, encontraram maior parasitismo de *M. javanica* e *M. incognita* raça 3 em tomateiro a 540 graus-dia. Para *H. glycines*, Alston & Schmitt (1988) observaram que o melhor intervalo para o desenvolvimento foi com temperaturas médias variando entre 21 e 31° C, acumulando  $429 \pm 24$  graus-dia. Lauritis *et al.* (1982) verificaram que, entre 5 e 30° C, 25° C proporcionou desenvolvimento mais rápido de *H. glycines* raça 3, acumulando 420 graus-dia. Já no intervalo de 5 e 32° C, Schneider *et al.* (1989) encontraram um acúmulo de 520 graus-dia.

## 6 CONCLUSÕES

1) O maior desenvolvimento e reprodução de *M. javanica* em todas as cultivares testadas ocorreu em temperatura do solo de 28° C.

2) De modo geral, o parasitismo de *H. glycines* raça 3 nas cultivares testadas foi favorecido no intervalo de temperatura de 24 a 28° C.

3) A temperatura não afetou a resistência da cultivar BRSMG Liderança a *H. glycines* raça 3, mas diminuiu a resistência da cultivar BRSMG Garantia e MGBR-46 a *M. javanica* a 28° C.

4) *M. javanica* requereu 425,76 graus-dia para completar o seu desenvolvimento após a penetração em soja e *H. glycines*, entre 452,64 e 545,76 graus-dia.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSTON, D.G.; SCHMITT, D.P. Development of *Heterodera glycines* life states as influenced by temperatura. *Journal of Nematology*, v.20, n.3, p.366-372, 1988.
- ALVES, F.R.; CAMPOS, V.P. Efeito do aquecimento do solo na resistência de plantas a *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raça 3. *Nematologia Brasileira*, v. 25, n. 2, p. 153-162, 2001.
- ARAÚJO, M.T. et al. Effect of diurnal changes in soil temperatures on resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato. *Journal of Nematology*, Gainesville, v. 14, n. 3, p. 414-416, July 1982.
- ANAND, S.C.; MATSON, K.W.; SHARMA, S.B. Effect of soil temperature and pH on resistance of soybean to *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v. 27, n. 4, Dec. 1995.
- BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T. JR.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, DeLeon Springs, v. 15, n. 1, p. 142-143, Dec. 1983.
- DROPKIN, V.H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*, v. 59, n. 11, p. 1632-1637, 1969.
- HAROON, S.A.; BAKI, A.A.; HUETTEL, R.N. An *in vitro* test for temperature sensitivity and resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato. *Journal of Nematology*, Lakeland, v. 25, n. 1, p. 83-88, Mar. 1993.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report*, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1128, 1973.
- INIMOTO, M. M. et al. Effect of soil temperature on tomato resistance to *Meloidogyne javanica*. *Summa Phytopathologica*, v.21, n. 2, p. 175- 177, 1995.
- KIM, D.G.; RIGGS, R.D. Cytopathological reactions of resistant soybean plants to nematode invasion. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). *Biology and management of the soybean cyst nematode*. St. Paul: APS, 1992. p. 157-168.

LAURITIS, J.A.; REBOIS, R.V.; GRANEY, L.S. Technique for gnotobiotic cultivation of *Heterodera glycines* Ichinohe on *Glycine max* (L.) Merr. **Journal of Nematology**, v.14, n.3, p. 422-424, July 1982.

MIZOBUTSI, E.H.; FERRAZ, S.; NEVES, W.S. Efeito da temperatura na resistência da linhagem L2300 do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) a *Heterodera glycines* raça 3. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 108-109, 2001.

NIBLACK, T.L. The race concept. In: RIGGS, E.D.; WRATHER, J.A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St. Paul: APS, 1992. p. 73-86.

NIBLACK, T.L. Dynamics and genetic of soybean cyst nematode populations. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 1999. p. 149-153. (Documento, 124).

OMWEGA, C.O.; THOMASON, J.I.; ROBERTS, P.A. Effect of temperature on expression of resistance to *Meloidogyne* spp. in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v.22, n. 4, p. 446-451, Oct. 1990.

SCHNEIDER, S.M.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R. A distributed development model of soybean cyst nematode. **Journal of Nematology**, v. 21, p. 587, 1989. Abstract.

TYLER, J. Development of the root-knot nematode as affected by temperature. **Hilgardia**, Oakland, v.7,n.10, p. 391-413, Apr. 1933.

## **CAPÍTULO 8**

**Flutuações térmicas na eclosão e no desenvolvimento embrionário de  
*Meloidogyne javanica*.**

## 1 RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Flutuações térmicas na eclosão e no desenvolvimento embrionário de *Meloidogyne javanica*. In: \_\_\_\_\_. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. 2003. Cap. 8. p. 167-187. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Ainda dentro do ovo, fatores abióticos influenciam o desenvolvimento, bem como a sobrevivência e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. O efeito relativo à temperatura constante tem sido estudado com várias espécies e populações de *Meloidogyne* spp. Entretanto, no campo predomina a flutuação da temperatura, principalmente as diárias e noturnas. Assim, objetivou-se estudar o efeito desta flutuação de temperaturas em população de ovos de *M. javanica* com estádios de desenvolvimento padronizados. Quando foram usados ovos com juvenis já formados, maior percentual de eclosão ocorreu em temperatura fixa de 28° C. A redução do tempo de exposição a esta temperatura reduziu a eclosão. A exposição dos ovos por 10 horas a 10° C seguido de 14 horas a 28° C, proporcionou maior eclosão dos J2 do que a de 10 horas a 5° C seguido de 14 horas a 28° C. Já a incubação em temperatura constante de 10° C proporcionou menor taxa de eclosão. Quando foram usados ovos no estágio de 2 células a incubação a 28° C acelerou a multiplicação celular e o desenvolvimento embrionário. Aos 4 dias de incubação já ocorria mais de 50% de ovos com juvenis. A incubação em temperatura constante de 10° C permitiu apenas a multiplicação celular. Em temperaturas variadas, por 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C, a inoculação proporcionou maior e mais rápido desenvolvimento do nematóide do que em 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C. Maior exposição a 28° C acelerou todos os processos envolvidos na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na saída do J2 do ovo. Entretanto, a interrupção desse processo por temperatura de 5° C causou efeitos deletérios irreversíveis nas células, embriões ou juvenis dentro dos ovos.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Temperature fluctuations in hatching and on embryonic development of *Meloidogyne javanica*. In:\_\_\_\_\_. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. Cap. 8. p. 167-187. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Still in the egg, abiotic factors affect the embryonic development, survival and hatching of second-stage juvenile (J2) of *Meloidogyne* spp. The effect of constant temperature has been studied with various species and populations of *Meloidogyne* spp. However, in the field, predominate the temperature fluctuation between day and night. Thus, its work aimed to study the effect of temperatures fluctuation in eggs population of *M. javanica* with standardized development. When eggs with formed juveniles inside were used, greater percentage on hatching occurred at fixed temperature of 28° C. The reduction of the exposure time at 28° C reduced hatching. The eggs exposure for 10 hours at 10° C complemented by 14 hours at 28° C gave greater J2 hatching compared to 10 hours at 5° C complemented by 14 hours at 28° C. The incubation at fixed temperature of 10° C gave low hatching. When eggs at the two-cell stage were used and incubated at 28° C the cell multiplication and embryonic development were speeded up. At four days of incubation at 28° C occurred more than 50% of the eggs with juveniles. The incubation at fixed temperature of 10° C allowed the cellular multiplication only. At alternated temperatures of 10 hours at 10° C and complemented by 14 hours to 28° C gave greater and faster nematode development than 10 hours at 5° C complemented by 14 hours at 28° C. Greater exposure at 28° C speeded up all the processes involved on cell multiplication, embryonic development and J2 hatching. However, the interruption of these processes by temperature of 5° C caused irreversible deleterious effect on cells, embryos and juveniles inside the eggs.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

A sobrevivência de fitonematóides em condições ambientais adversas pode variar entre as espécies e entre os seus estádios de desenvolvimento. No ovo ocorrem a multiplicação celular, formação e organização dos tecidos, desenvolvimento embrionar passando pelos períodos de mórula, blástula e gástrula, formando o juvenil do primeiro estádio que após a primeira ecdise passa a juvenil do segundo estádio (J2) (Campos *et al.*, 2001). Ainda dentro do ovo, vários fatores abióticos podem influenciar nesse desenvolvimento, bem como a sobrevivência e a eclosão de J2 de *Meloidogyne* spp.

Nas condições de campo, entretanto, a temperatura é um fator extremamente importante para o sucesso do desenvolvimento e a manutenção da população do nematóide dentro ou fora da planta (Evans, 1987). O fator temperatura pode controlar o desenvolvimento embrionário dentro dos ovos e a habilidade do J2 em romper e liberar a casca do ovo (Lee & Atkinson, 1977). Entretanto, as pesquisas já realizadas, além de utilizar populações de ovos com vários estádios de desenvolvimento, avaliaram o efeito de temperaturas fixas ou em intervalos sem a determinação do tempo de exposição na embriogênese e na eclosão de J2 de *Meloidogyne*. Assim, Decker (1989) e Wallace (1971) verificaram que o intervalo de temperatura entre 15 e 30° C possibilita o desenvolvimento da maioria das espécies de *Meloidogyne*. Há também um efeito específico entre espécies quanto à temperatura. Ovos de *M. hapla* desenvolveram embriões a 8°C, o que não aconteceu com *M. incognita* (Vrain & Barker, 1978). A taxa de embriogênese em *M. javanica* sob temperatura de 15°C foi aproximadamente 4 a 5 vezes menor do que aquela em 30°C (Bird, 1972). Para *M. javanica*, a eclosão de J2 ocorreu mais rapidamente a 25°C (Bird, 1972; Vrain, 1978). No entanto, a taxa de eclosão de J2 foi insignificante abaixo de



12°C e 15°C para *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente (Bird & Wallace, 1965; Goodell & Ferris, 1989). Aproximadamente 85% dos ovos de *M. javanica* submetidos à temperatura de 8°C por 30 dias tiveram retardamento da eclosão dos J2, quando comparado àqueles não submetidos a baixa temperatura (Huang & Pereira, 1994). Já *M. chitwoodi* e *M. hapla* apresentaram taxas de eclosão satisfatórias mesmo em temperaturas próximas de 10°C (Santo & O'Bannon, 1981).

No entanto, pouco se sabe sobre o efeito de temperaturas alternadas na eclosão de J2 e no desenvolvimento embrionário. Desta forma, neste trabalho objetivou avaliar: a) o percentual de eclosão de J2 de *M. javanica* a partir da incubação de ovos contendo juvenis formados em temperaturas alternadas ou fixas por diferentes períodos de tempo; e b) o progresso de desenvolvimento embrionário após a incubação de ovos no estágio de 2 células em temperaturas alternadas ou fixas por diferentes períodos de tempo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio embrionário de duas células ou contendo juvenis.

Raízes galhadas de plantas jovens de soja cultivar Embrapa 20, aos 22 dias após inoculação e galhas de plantas velhas, foram coletadas, separadamente, e os ovos foram extraídos conforme a técnica de Hussey & Barker (1973). As impurezas misturadas aos ovos foram eliminadas vertendo-se a suspensão em peneira de 0,025mm e os ovos foram recolhidos com solução de sacarose (454g de açúcar por litro de água), centrifugada a 1700 rpm por 1 minuto. Em seguida, verteu-se o sobrenadante contendo os ovos em peneira de 0,01025 mm, enxaguando-os em água corrente. A suspensão de ovos livres de impurezas foi submetida a desinfestação superficial em solução de pentabiótico 300 ppm por 4 minutos. A seguir foi vertida, novamente, em peneira de 0,025 mm, e os ovos foram enxaguados com água de torneira autoclavada.

As suspensões de ovos desinfestados foram colocadas em placas de vidro e levadas para microscópio de objetiva invertida. Da suspensão obtida de raízes de plantas jovens foram separados apenas ovos no estágio de duas células. Daquela obtida de galhas de plantas velhas foram separados ovos contendo juvenis.

### 4.2 Efeito de temperaturas fixas e variadas na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Vinte ovos contendo juvenis, constituindo a unidade experimental, foram transferidos para cada célula da placa de Elisa. Essas placas foram

aconditionadas em caixas plásticas (gerbox) e transferidas para câmaras com temperatura fixas de 10 ou 28° C e temperaturas variadas: a) incubação por 10 horas a 5° C seguida de 14 horas a 28° C; b) incubação por 10 horas a 10° C seguida de 14 horas a 28° C. Nessas temperaturas os ovos com juvenis já formados foram incubados por 11 dias. A cada 24 horas quantificou-se, de 6 repetições de cada tratamento térmico, o número de J2 eclodidos. Obteve-se, no final, o total de J2 eclodidos nos 11 dias de incubação em cada tratamento térmico. Também calculou-se o progresso da eclosão em cada dia de incubação.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos térmicos e 11 períodos de incubação em 6 repetições.

A análise de variância assim como as de regressões foram realizadas com o programa SAS User'S guide: statistics, version 8 (SAS Intitute Inc., Cary, USA, 1999). As fontes de variação significativas pelo teste F foram empregadas para construir os modelos de regressão, e em seguida foram plotadas as curvas.

#### **4.3 Efeito de temperaturas fixas e variadas no desenvolvimento embrionário de *Meloidogyne javanica*.**

Vinte ovos no estágio de duas células, constituindo a unidade experimental, foram transferidos para cada célula de placa de Elisa. Essas placas foram acondicionadas em caixas plásticas (Gerbox) e incubadas nas mesmas temperaturas descritas no ensaio anterior. Nessas temperaturas os ovos com 2 células foram incubados por 12 dias. A cada 3 dias quantificou-se, de 4 repetições de cada tratamento térmico, o percentual de ovos nos estádios, de duas e quatro células, pluricelular, gástrula, tadpole, com juvenil formado, além da avaliação dos J2 eclodidos. Obteve-se, no final, o total de cada estágio nos 12

dias de incubação em cada tratamento térmico também calculou-se o progresso do desenvolvimento de cada estágio em cada dia de incubação.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos térmicos e 4 períodos de incubação em 4 repetições.

Os dados obtidos foram transformados em raiz de  $x + 0,5$  para a realização da análise de variância. Nos dois ensaios utilizou-se o programa Sisvar na análise de variância e as médias foram comparadas através do teste de Scott & Knott (1974) a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito de temperaturas fixas e variadas na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Durante o período de 11 dias de incubação dos ovos com juvenis já formados à temperatura constante de 28° C, proporcionou maior eclosão de J2 de *M. javanica*, seguido dos tratamentos em que a exposição a 28° C foi de apenas 14 horas por dia (Figura 1). Entretanto, a exposição por 10 horas a 10° C complementada por 14 horas a 28° C, propiciou melhor eclosão de J2 do que a 5° C. A incubação em temperatura constante de 10° C propiciou a menor eclosão. Na temperatura constante de 28° C e na alternada de 10° C por 10 horas seguida de 28° C por 14 horas, a eclosão de J2 foi progressiva ao longo do período de incubação. Porém, a 10° C e na alternada de 5° C por 10 horas seguida de 28° C por 14 horas, houve tendência de estabilização na eclosão dos J2 a partir do 7<sup>o</sup> dia de incubação. Quando diminuiu-se o período de exposição a 28° C os valores em eclosão foram intermediários entre as temperaturas constantes de 28° C e 10° C. Contudo, a exposição por 10 horas a 10° C propiciou sempre maior eclosão do que aquela a 5° C (Figura 1).

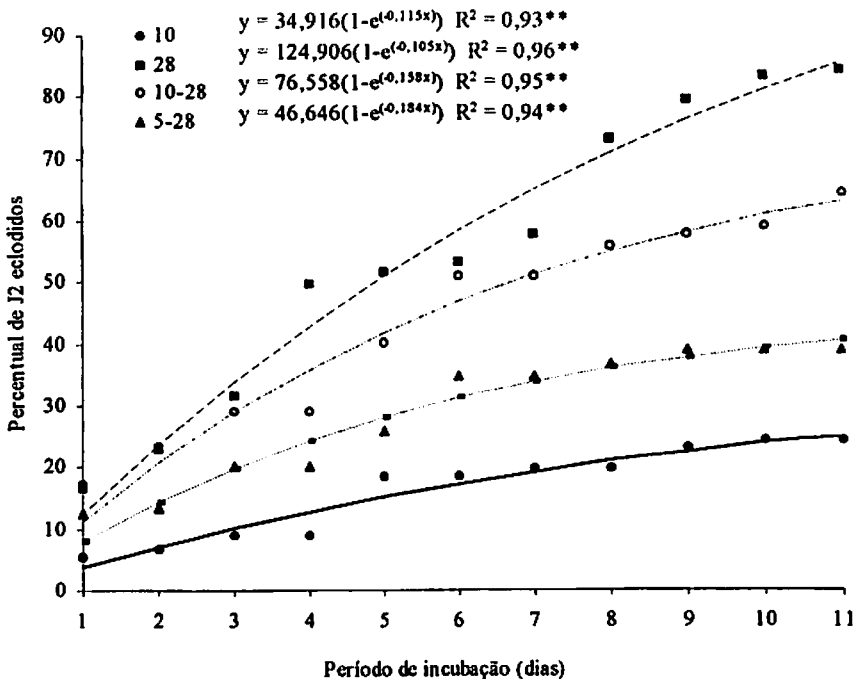


FIGURA 1- Efeito de temperaturas fixas e variadas no percentual de eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* a partir de ovos contendo juvenis já formados internamente e incubados por diferentes períodos de tempo em dias.

Como os ovos empregados neste ensaio já continham o juvenil formado, a maior eclosão a 28° C indica que esta temperatura é mais adequada ao processo de saída do J2 do ovo do que a de 10° C. Além disto, a redução do tempo de exposição à temperatura de 28° C reduz a eclosão. Portanto, a redução da temperatura durante a noite leva a queda na eclosão. Freire & Ferraz (1977) também encontraram maior eclosão de J2 de *M. incognita* e de *M. javanica* em

temperatura de 28° C, embora Bird (1972) e Vrain (1978) tenham observado que a eclosão de J2 de *M. javanica* foi mais rápida em temperaturas constantes de 25° C e de 30° C. Porém, a taxa de eclosão de J2 foi insignificante abaixo de 12 e 15° C para *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente (Bird & Wallace, 1965; Goodell & Ferris, 1989). A 8° C, 85% dos ovos de *M. javanica* tiveram a eclosão inibida, quando comparados àqucles não submetidos a baixa temperatura (Huang & Pereira, 1994). Entretanto, como esses autores não usaram população homogênea de ovos com o juvenil já formado, esses efeitos podem ter ocorrido em fases anteriores à formação do juvenil, como multiplicação celular e desenvolvimento embrionário.

## **5.2 Efeito de temperaturas fixas e variadas no desenvolvimento embrionário de *Meloidogyne javanica*.**

Durante o período de 12 dias de incubação de ovos no estágio de duas células a 10° C foi maior ( $P \leq 0,05$ ) o número de ovos com 2 células e distribuído ao longo dos 12 dias. Nas demais temperaturas de incubação, esse estágio se concentrou nos 3 primeiros dias de incubação. O menor número de ovos com 2 células ocorreu quando da incubação em temperatura constante de 28° C (Figura 2). O número de ovos com 4 células teve resultados semelhantes àquele de 2 células (Figura 2). Aos 6 dias de incubação o número de ovos no estágio pluricelular foi maior ( $P \leq 0,05$ ) quando incubado por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C, seguido das incubações em temperatura constante de 10° C e de 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C (Figura 3). Esse estágio não ocorreu na incubação a temperatura constante de 28° C (Figura 3). O estágio pluricelular tem distribuição ao longo do período de incubação nas temperaturas estudadas, exceto na temperatura constante de 28° C em que ocorreu com alta porcentagem até o 3º dia de incubação (Figura 3). Por outro lado quando se incubou em

temperatura constante de 10° C, o estágio pluricelular ocorreu em mais de 50% da população de ovos a partir do 6º dia até o final do período. Na incubação em temperaturas variadas a situação foi diferente. Mais de 50% do estágio pluricelular ocorreu no período de 3 a 6 dias de incubação dos ovos por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C. Quando se incubou 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C mais de 50% desse estágio ocorreu até os 3 dias de incubação.

O número de ovos no estágio de gástrula apresentou distribuição ao longo dos 12 dias de incubação bem diferente daquela do estágio pluricelular. Esse estágio foi observado apenas no regime de temperatura fixa de 28° C e temperaturas variadas por 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C nos três primeiros dias de incubação. A 10° C, ele não foi observado em nenhum período de incubação (Figuras 2, 3, 4 e 5). Na incubação em temperatura constante de 28° C, observou-se o estágio de gástrula no 3º dia. Entretanto, quando se incubou por 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C a gástrula foi observada a partir do terceiro dia até o final. Já em incubação por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C, observou-se gástrula a partir do 9º dia até o final (Figuras 4 e 5). O número de ovos no estágio tadpole teve resultado bem semelhante àquele da gástrula (Figuras 3, 4 e 5). O juvenil formado dentro do ovo não ocorreu em nenhum período de incubação em temperatura constante de 10° C. Contudo a 28° C mais de 50% dos ovos tinham juvenis a partir do 6º dia até o final (Figuras 3, 4 e 5). Quando se incubou por 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C o juvenil dentro do ovo foi observado a partir do 9º dia até o final, porém em porcentagem diária menor ( $P \leq 0,05$ ) do que aquela na temperatura constante a 28° C. Contudo, quando se incubaram os ovos por 10 horas a 5° C e 14 horas a 28° C o estágio de juvenil formado dentro do ovo foi observado apenas após o 12º dia de incubação em porcentagem diária menor do que aquela incubada por 10 horas a 10° C e 14 horas a 28° C. A 28° C observou-se elevada porcentagem de ovos com juvenil e diferente ( $P \leq 0,05$ ) dos demais regimes térmicos. A eclosão de J2 a 28° C



ocorreu a partir do 9º dia até o final. O mesmo ocorreu quando se incubaram os ovos por 10 horas a 10º C e 14 horas a 28º C, porém, a eclosão ocorreu em percentagem diária bem inferior aquela a temperatura constante de 28º C (Figuras 4 e 5). Nenhuma eclosão ocorreu em qualquer período de incubação em temperatura constante de 10º C e naquele por 10 horas a 5º C e 14 horas a 28º C.

O baixo percentual de ovos com 2 células e alto no estágio pluricelular nos 3 primeiros dias, quando incubados a 28º C, indica que foi rápida a multiplicação celular, bem como o desenvolvimento embrionário, já que com 6 dias já se encontravam mais de 80% dos ovos com juvenis.

A alta porcentagem de ovos no estágio pluricelular e a inexistência de outros estádios até o período final da inoculação em 10º C, indica que essa temperatura não limita a multiplicação celular, mas inibe o desenvolvimento embrionário e a eclosão. Entretanto, não se pode definir se os ovos no estágio pluricelular manterão viáveis ou não por algum período de tempo.

A alternância de períodos de temperaturas de 5º C e 10º C, complementada com 28º C, leva a grande redução no desenvolvimento embrionário. Porém, a alternância com temperaturas de 5 e 28º C levou à inibição da eclosão. Desta forma, para que ocorra intenso desenvolvimento embrionário e eclosão no campo, serão necessários noites e dias quentes sem queda de temperatura noturna.

A taxa de embriogênese em *M. javanica* sob temperatura constante de 15º C foi aproximadamente 4 a 5 vezes menor do que aquela em 30º C (Bird, 1972). Segundo Vrain & Barker (1978), as condições térmicas ótimas para a embriogênese de *M. incognita* estão entre 25 e 30º C, pois em temperatura constante de 8º C o desenvolvimento dos embriões de *M. incognita* não ocorreu. Bergeson (1959) observou redução de mais de 75% na sobrevivência de embriões dentro dos ovos de *M. incognita* quando submetidos a temperaturas inferiores a 10º C. De fato, Dutra (2002) verificou efeito deletério em ovos de *M.*

*incognita* incubados a 8° C. A falta de uma adaptação do ovo ao meio externo o torna suscetível a injúrias proporcionadas por temperaturas baixas (Vrain & Barker, 1978).

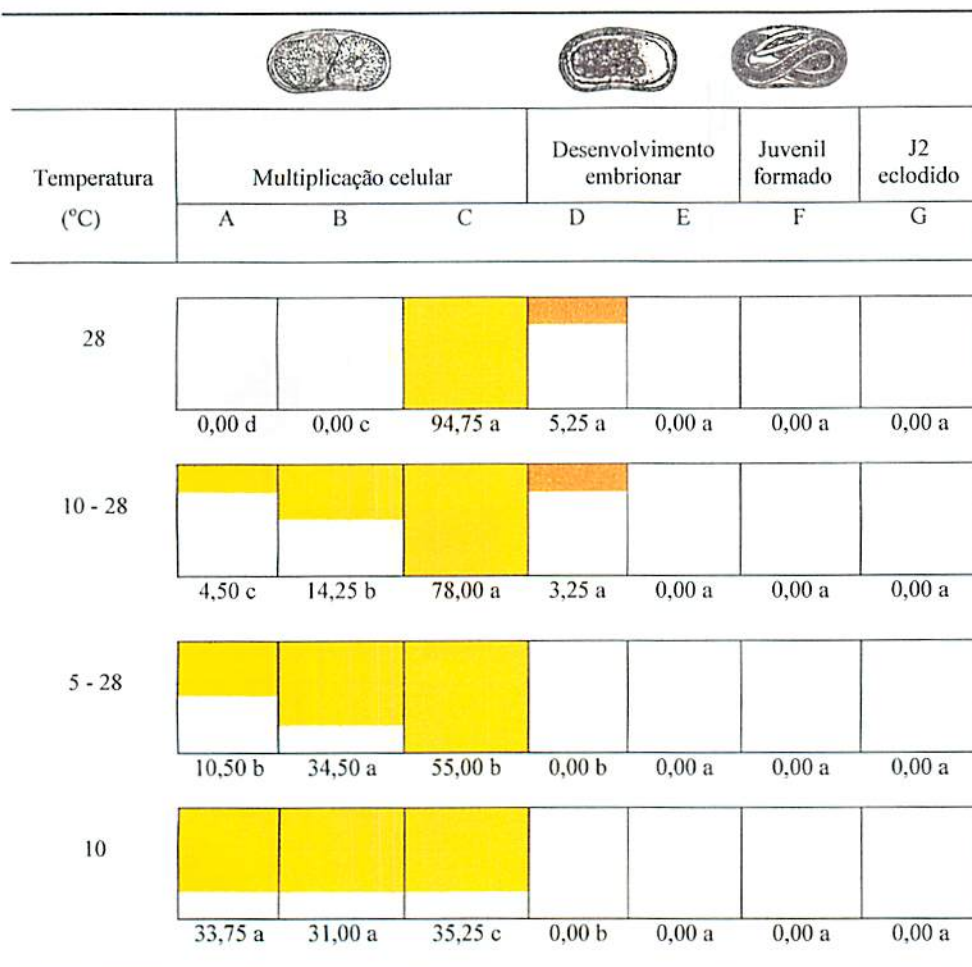


FIGURA 2- Desenvolvimento embrionário de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de 2 células incubados por 3 dias em temperaturas fixas e alternadas. Fase de multiplicação celular (A = 2 células; B = 4 células; C = Pluricelular); Desenvolvimento embrionar (D = Gástrula; E = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionar (F = Juvenil dentro do ovo; G = J2 eclodido) e a porcentagem de cada um deles. Médias nas colunas entre temperaturas dentro do mesmo estágio, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

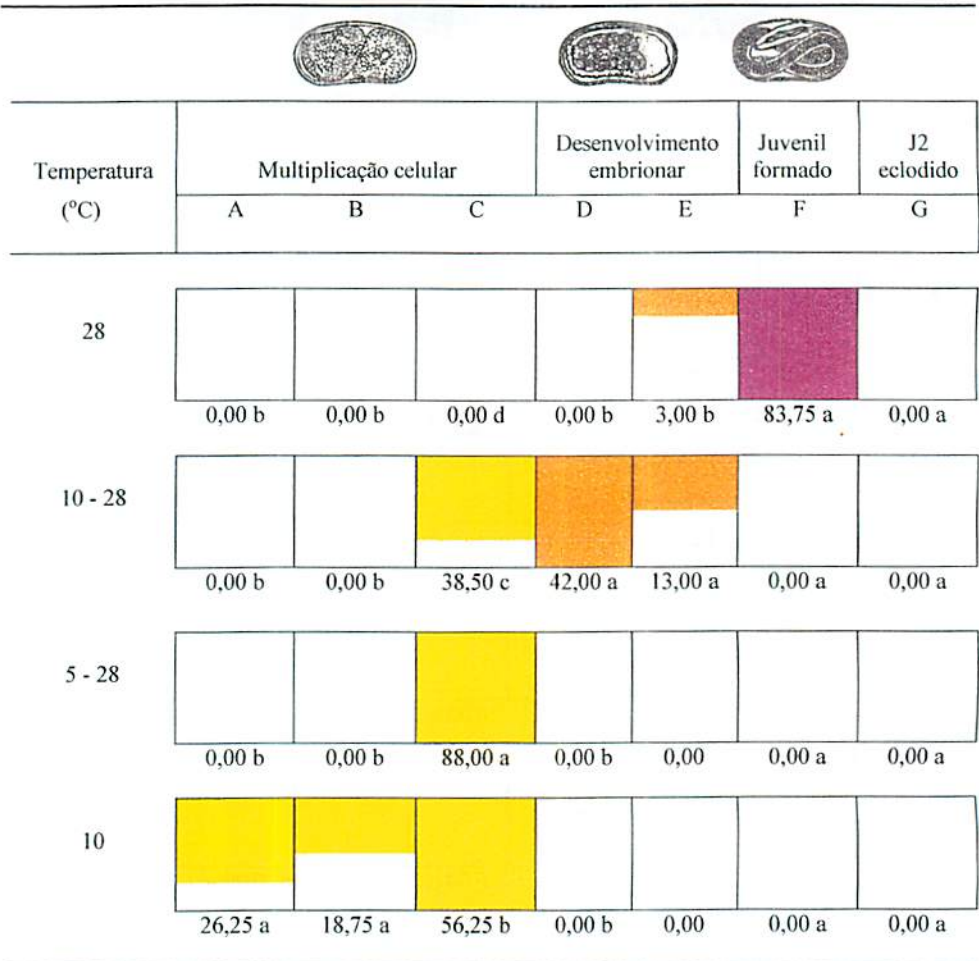


FIGURA 3- Desenvolvimento embrionário de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de 2 células incubados por 6 dias em temperaturas fixas e alternadas. Fase de multiplicação celular (A = 2 células; B = 4 células; C = Pluricelular); Desenvolvimento embrionar (D = Gástrula; E = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionar (F = Juvenil dentro do ovo; G = J2 eclodido) e a porcentagem de cada um deles. Médias nas colunas entre temperaturas dentro do mesmo estágio, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

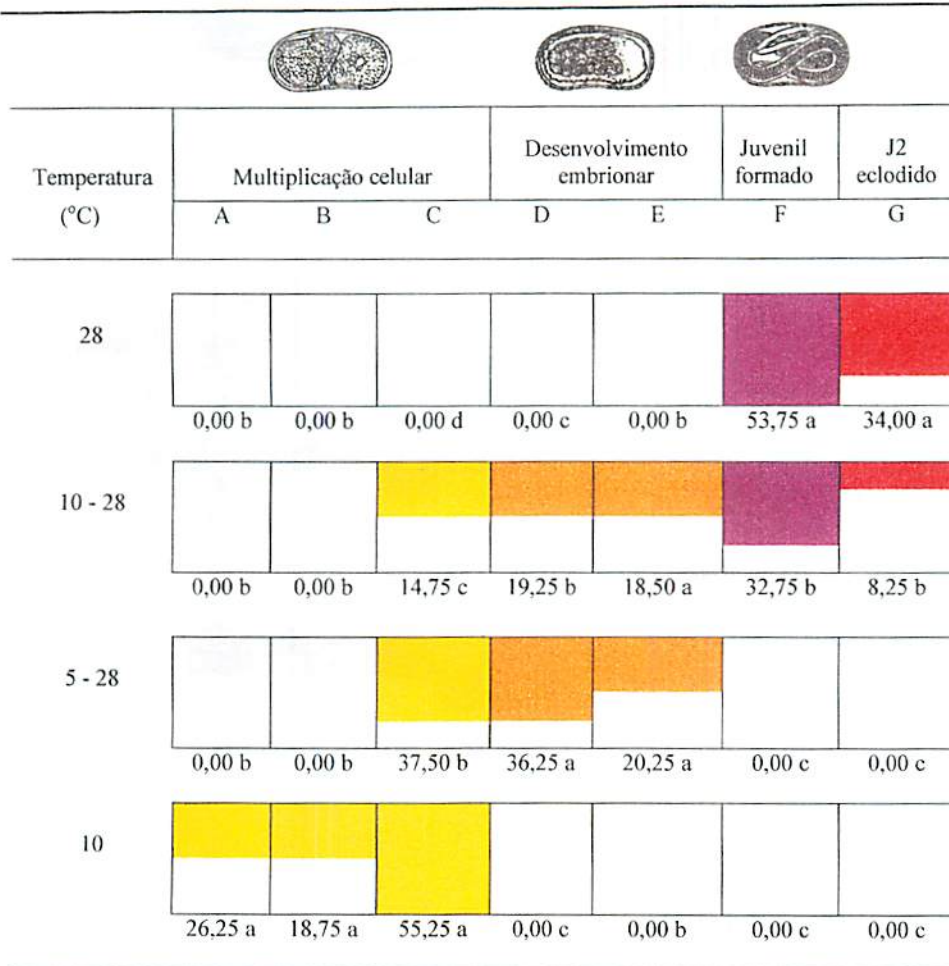


FIGURA 4- Desenvolvimento embrionário de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de 2 células incubados por 9 dias em temperaturas fixas e alternadas. Fase de multiplicação celular (A = 2 células; B = 4 células; C = Pluricelular); Desenvolvimento embrionar (D = Gástrula; E = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionar (F = Juvenil dentro do ovo; G = J2 eclodido) e a porcentagem de cada um deles. Médias nas colunas entre temperaturas dentro do mesmo estágio, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

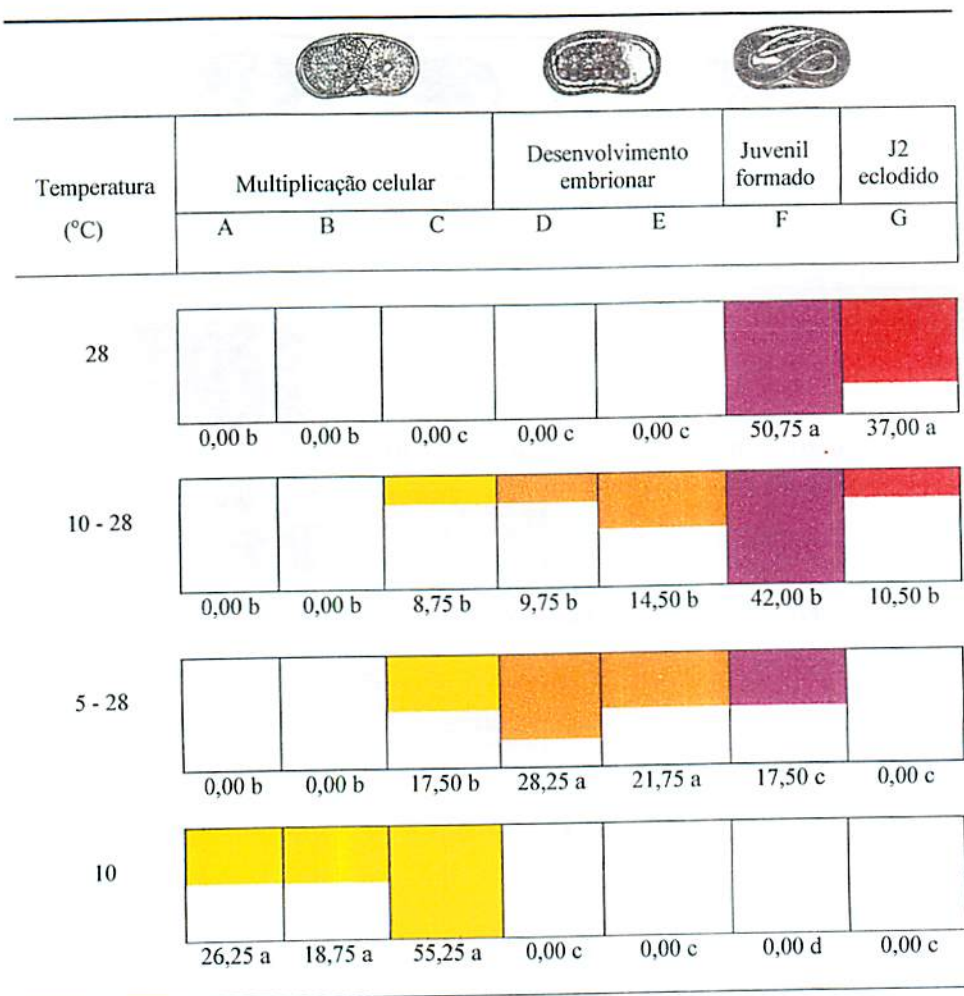


FIGURA 5- Desenvolvimento embrionário de ovos de *Meloidogyne javanica* no estágio de 2 células incubados por 12 dias em temperaturas fixas e alternadas. Fase de multiplicação celular (A = 2 células; B = 4 células; C = Pluricelular); Desenvolvimento embrionar (D = Gástrula; E = Tadpole); Final do desenvolvimento embrionar (F = Juvenil dentro do ovo; G = J2 eclodido) e a porcentagem de cada um deles. Médias nas colunas entre temperaturas dentro do mesmo estágio, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) O maior percentual de eclosão ocorreu em temperatura fixa de 28° C. A redução do tempo de exposição a esta temperatura reduziu a eclosão.
- 2) A exposição dos ovos por 10 horas a 10° C seguido de 14 horas a 28° C, proporcionou maior eclosão dos J2 do que a de 10 horas a 5° C seguido de 14 horas a 28° C. Já a incubação em temperatura constante de 10° C proporcionou menor taxa de eclosão.
- 3) A 28° C acelerou-se a multiplicação celular e o desenvolvimento embrionário dentro dos ovos. Aos 6 dias observou mais de 80% de ovos com juvenis.
- 4) A incubação em temperatura constante de 10° C permitiu apenas a multiplicação celular.
- 5) Temperaturas variadas por 10 horas a 10° C seguida de 14 horas a 28° C, proporcionou maior e mais rápido desenvolvimento do nematóide do que 10 horas a 5° C seguida de 14 horas a 28° C.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGESON, G.B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne* in the absence of a host. *Nematologica*, v.4, p. 344-354, 1959.

BIRD, A.F. Influence of temperature on embryogenesis in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, v.4, p. 206-213, 1972.

BIRD, A.F.; WALLACE, H.R. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, v.11, p. 581-589, 1965.

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

DECKER, H. *Plant nematodes and their control (Phytonematology)*. New York: Brill, 1989. 540p.

DUTRA, M.R. Manejo do solo e da água no controle de nematóides de galhas (*Meloidogyne* sp.) e estudos “in vitro” da temperatura e umidade na infectividade desses patógenos. 2002. 131p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

EVANS, A.A.F. Diapause in nematodes as a survival strategy. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. *Vistas on nematology*. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p.180-187.

FREIRE, F.C.O.; FERRAZ, S. Resistência de cultivares de feijociro a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e influência da temperatura e exsudatos radiculares sobre a eclosão de seus Juvenis. *Revista Ceres, Viçosa*, v. 24, n. 133, p. 247-260, 1977.

GOODELL, P.B.; FERRIS, H. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, v.21, n.3, p.328-334, 1989.

HUANG, S.P.; PEREIRA, A.C. Influence of inoculum density, host, and low-temperature period on delayed hatch of *Meloidogyne javanica* eggs. *Journal of Nematology*, v.26, n.1, p.72-75, 1994.



HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1128, 1973.

LEE, D.L. ATKINSON, H.J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University, 1977. 215p.

SANTO, G.S.; O'BANNON, J.H. Effect of soil temperature on the pathogenicity and reproduction of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* on Russet Burbank potato. **Journal of Nematology**, v.13, p. 483-486, 1981.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

VRAIN, T.C. Influence of chilling and freezing temperatures on infectivity *Meloidogyne incognita* and *M. hapla*. **Journal of Nematology**, v.10, n.2, p.177-180, 1978.

VRAIN, T.C.; BARKER, K.R. Influence of low temperature on development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* eggs in eggs masses. **Journal of Nematology**, v.10, n.4, p.311-313, 1978.

WALLACE, H.R. The influence of temperature on embryonic development and hatch of *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, v. 171, p. 170-186, 1971.

## **CAPÍTULO 9**

**Penetração e reprodução de *Meloidogyne javanica* em raiz seccionada de soja  
e evasão de juvenis do segundo estágio**

## 1 RESUMO

CAMPOS, Hercules Diniz. Penetração e reprodução de *Meloidogyne javanica* em raiz seccionada de soja e evasão de juvenis do segundo estágio. In: \_\_\_\_\_. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. 2003. Cap. 9. p. 188-203. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O parasitismo de *Meloidogyne* é, normalmente, estudado em plantas intactas, e pouco se sabe sobre a capacidade de evasão de J2 das raízes de plantas hospedeiras. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de penetração, desenvolvimento e reprodução de *M. javanica* em soja com raízes seccionadas, e determinar a taxa de evasão de *M. javanica* em raízes de soja suscetível. O corte das raízes afetou quantitativamente a penetração, o desenvolvimento e a reprodução de *M. javanica* em soja comparada com a planta com o sistema radicular intacto. Quanto maior foi a seção feita nas raízes, menor foi a penetração, o número de fêmeas e massas de ovos. A seção feita a 30 mm da coifa proporcionou os menores números de J2, fêmeas, massas de ovos e de ovos, significativamente diferentes daqueles da seção a 5 mm da coifa. A reprodução de *M. javanica* avaliada em ovos por sistema radicular como por grama de raiz foi a mais alta ( $P \leq 0,05$ ) na planta com raízes intactas e significativamente reduzida com o tamanho da seção feita na raiz. O número de J2 evadidos foi baixo, chegando a 4,17% aos 20 dias. O sucesso no desenvolvimento pós-embriônico de *M. javanica* variou de 90,28 a 97,22% aos 20 e 12 dias após a inoculação, respectivamente. A população de fêmeas foi proporcional ao número de J2 penetrados a partir de 4 dias da inoculação.

---

\* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos- UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAMPOS, Hercules Diniz. Penetration and reproduction of *Meloidogyne javanica* in cut root of soybean and evading of second-stage juveniles. In:\_\_\_\_\_. Aspects of parasitism and starvation of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and cyst (*Heterodera glycines*) in soybean. 2003. Cap. 9. p. 188-203. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The parasitism of *M. javanica* is, normally, studied in intact plants, and few is known on evading of J2 from roots of susceptible plants. This work aimed to evaluate the penetration, development and reproduction of *M. javanica* in cut root of susceptible soybean. The extension of the root cutting affected quantitatively the penetration of J2, development and reproduction of *M. javanica* in soybean compared to plant with intact root system. Greater extension of root cutting, lesser were the penetration of J2, number of female in the root and egg-mass. The cutting of 30 mm from the root cap resulted in lesser ( $P \leq 0,05$ ) number of J2, female, eggs-mass and eggs compared to 5 mm section. The number of eggs by root system and per gram of root were higher ( $P \leq 0,05$ ) in intact roots than in cut root system, and proportionally lesser according to the extension of the root cutting. The numbers of evaded J2 was low, reaching 4,17% of the total inoculated J2 at 20 days after inoculation. The success on post-embryonic development of *M. javanica* varied from 90,28 to 97,22% at 20 and 12 days after inoculation, respectively. The female population was proportional to the penetrated J2 into the root after 4 days from the inoculation.

---

\* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Edson Ampélio Pozza- UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende- UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

A atração do nematóide para as raízes da planta pode ou não favorecer o parasitismo, dependendo dos eventos que ocorrem no seu corpo e na planta hospedeira (Faria *et al.*, 2003). Esses eventos na planta hospedeira podem ser de natureza dinâmica, como a resposta ao ataque do nematóide, formando ou não o sítio de alimentação na maioria das relações nematóide sedentário e planta suscetível (Campos *et al.*, 2001). Todavia, injúrias nas raízes de causas diversas formam outra fonte de alteração no hospedeiro, pouco investigada quanto ao efeito na relação nematóide-planta.

Outro aspecto da relação nematóide-planta é o papel dinâmico do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. No solo, o J2 precisa ser atraído e orientado em direção ao local de penetração na raiz. Depois de vencer as primeiras camadas de tecido no processo de penetração, precisa orientar-se em direção ao local que receberá o estímulo para produzir o seu sítio de alimentação (Hussey & Grundler, 1998). Entretanto, após a penetração na raiz e antes de se tornar sedentário, o J2 ainda pode evadir-se da raiz. Esse fato foi observado apenas em genótipos de plantas resistentes, como verificado por Reynolds *et al.* (1970), trabalhando com *M. incognita acrita* em genótipos resistentes de alfafa, Herman *et al.* (1991), com *M. incognita* em soja resistentes, e Windham & Willians (1994), quando avaliaram a resistência de milho a *M. incognita*. Portanto, ainda não se sabe a proporção de evasão de *M. javanica* em soja suscetível durante o desenvolvimento do nematóide até o seu estágio adulto na planta.

Desta forma, este estudo teve como objetivos: a) avaliar a capacidade de penetração, desenvolvimento e reprodução de *M. javanica* em plantas de soja

com raízes seccionadas; b) avaliar a taxa de evasão de *M. javanica* em raízes de plantas de soja suscetível até o estágio adulto.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica*.

Os juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* foram obtidos conforme descrito no capítulo 2, em 4.1.

### 4.2 Efeito do sectionamento radicular da soja na penetração, desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne javanica*.

Sementes de soja do cultivar Embrapa-20 foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto, colocadas para germinar em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ$  C. Após 8 dias da semeadura, plântulas foram retiradas das bandejas e as pontas das raízes foram sectionadas a 5, 15 e 30 mm a partir da coifa. Plântulas intactas serviram de testemunha. Plântulas intactas e sectionadas foram transplantadas para copos plásticos com capacidade para 300 cm<sup>3</sup> contendo areia fina quartizífera autoclavada. Infestou-se a areia de cada copo com 500 J2 contidos em suspensão de 5 mL e os copos foram mantidos em sala climatizada a  $27 \pm 2^\circ$  C.

Foi empregado o delineamento estatístico inteiramente casualizado com 4 tratamentos (plântulas sectionadas em 3 posições e intactas) em 6 repetições.

Aos 4 e aos 20 dias após a inoculação foram colhidas seis repetições. As plântulas foram retiradas dos copos com auxílio de jato de água. Os sistemas radiculares foram lavados e submetidos ao clareamento dos tecidos em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 6 minutos para raízes com 4 dias da inoculação e 10 minutos para aquelas com 20 dias. Foram lavados em água

corrente para eliminar todo o resíduo do hipoclorito. Em seguida, foram transferidos para tubos de vidro onde foi adicionada solução corante diluída até cobri-los, preparada com 3,5 gramas de fucsina ácida + 250 mL de ácido láctico + 750 mL de água destilada (adaptado de Byrd *et al.*, 1983) e diluída 1: 29 (1mL de solução corante inicial + 29 mL de água destilada). Foram mantidos imersos por 2 minutos em banho-maria com água em ebulição. O resfriamento total foi feito em condições ambientes durante a noite. As raízes foram, então, lavadas para eliminar o excesso de corante e recolocadas nos tubos. Cobriram-se todas com solução de glicerina 1:1 (glicerina pura + água destilada) e deixadas em repouso por, no mínimo, duas horas. Em seguida foram montadas em lâmina de vidro, sobre as quais foram colocadas gotas de glicerina pura, sobrepondo outra lâmina de vidro, e analisadas em microscópio. Quantificou-se o número de J2 penetrados, o número de fêmeas e o de fêmeas desenvolvidas nos tecidos após o corte e nas raízes intactas.

Vinte oito dias após a inoculação, as plantas foram retiradas dos copos com auxílio de jato de água. Os sistemas radiculares foram lavados e imersos por 15 minutos em solução de floxina B 0,0015% para coloração das massas de ovos de vermelho. Os sistemas radiculares foram colocados sobre papel toalha por 10 minutos para retirar o excesso de água e possibilitar a avaliação do peso fresco das raízes, seguido da contagem do número de massas de ovos por sistema radicular. Para extração dos ovos, utilizou-se a técnica de Hussey & Barker (1973), e em microscópio de objetiva invertida estimou-se o número de ovos de *M. javanica* por sistema radicular (total) e por grama de raiz.



### 4.3 Penetração e evasão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em raiz de soja.

Sementes de soja do cultivar Embrapa-20 foram desinfestadas e colocadas para germinar em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada. Após 3 dias da semeadura, as sementes germinadas foram transplantadas para tubos contendo areia fina quartizífera umedecida. Vinte e quatro horas após, foi infestada com 100 J2 de *M. javanica* e os tubos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Aos 4, 12 e 20 dias da inoculação, as plantas foram retiradas dos tubos jorrando água em suas bordas. Os sistemas radiculares foram enxaguados, submetidos ao clareamento dos tecidos seguido de coloração dos J2 nos tecidos da raiz e montagem das lâminas para análise em microscópio. Quantificou-se o número de nematóides dentro das raízes, representados por J2 aos 4 dias da inoculação, o somatório de J3, J4 e fêmeas aos 12 e somente fêmeas aos 20 dias da inoculação. A seguir, calculou-se o número de nematóides evadidos das raízes aos 12 e 20 dias da inoculação, subtraindo do número de J2 observados aos 4 dias da inoculação aqueles obtidos aos 12 e aos 20 dias após a inoculação, e o percentual de sucesso no desenvolvimento obtidos através da divisão do somatório de J3, J4 e fêmeas aos 12 ou de fêmeas aos 20 dias pelo número de J2 obtido aos 4 dias após a inoculação e multiplicado por 100.

Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado com 3 épocas de avaliação, em 6 repetições.

O número de nematóides evadidos foi transformado em raiz de  $x + 0,5$  para a realização da análise de variância. Na análise de variância utilizou-se o programa Sisvar e as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O corte das raízes da soja afetou quantitativamente a penetração, o desenvolvimento e a reprodução de *M. javanica*, comparada com o sistema radicular intacto. Quanto maior foi a seção feita nas raízes, menor foi a penetração, o número de fêmeas e de massas de ovos, às vezes não significativo estatisticamente (Figura 1). O número de fêmeas encontradas após a região seccionada foi maior ( $P \leq 0,05$ ), proporcionalmente ao tamanho da seção feita. No entanto, a maioria das fêmeas nas plantas com as raízes do sistema radicular seccionado foram encontradas nas raízes intactas que se desenvolveram após o seccionamento. A seção feita a 30 mm da coifa proporcionou os menores números de J2, fêmeas, massas de ovos e ovos, significativamente diferentes daqueles obtidos da seção a 5 mm da coifa (Figura 1 e 2).

A reprodução de *M. javanica* avaliada em ovos por sistema radicular como por grama de raiz foi a mais alta ( $P \leq 0,05$ ) na planta com raízes intactas e significativamente reduzida com o tamanho da seção feita na raiz (Figura 2).

Na avaliação da evasão de J2 das raízes de soja, verificou-se que o número de J2 aos 4 dias após a inoculação, o somatório de juvenil do terceiro (J3), quarto (J4) e fêmeas aos 12 dias e apenas fêmeas aos 20 dias foram semelhantes ( $P \leq 0,05$ ). O número de J2 evadidos foi baixo, chegando a 4,17% aos 20 dias (Figura 3). O sucesso no desenvolvimento pós-embriônico de *M. javanica* variou de 90,28 a 97,22% aos 20 e 12 dias após a inoculação, respectivamente.

Esses resultados indicam que maior quantidade de injúrias nas raízes afetam diretamente a população de fitonematóides, devido à maior quantidade de substâncias liberada pelas regiões seccionadas e acumuladas no substrato, causando efeito tóxicos ou repelindo os J2 das raízes. Segundo Rocha (2003), a

incubação de J2 de *M. incognita* em exsudato radicular de soja por 12 horas reduziu drasticamente a mobilidade e causou mais de 20% de mortalidade desses J2. A penetração nas raízes de soja foi também reduzida significativamente quando o substrato utilizado para o crescimento das plantas foi umedecido com o próprio exsudato radicular de soja (Rocha, 2003).

Muitas vezes as substâncias liberadas nas raízes podem ter efeitos tanto de atração como de repelência aos nematóides. Klingler (1965) observou que certos aminoácidos e CO<sub>2</sub> liberados pelas raízes proporcionaram efeito atrativo para fitonematóides. Ao contrário, Diez & Dusenbery (1989) observaram que exsudato de tomate causou alta atividade repelente a *M. incognita*.

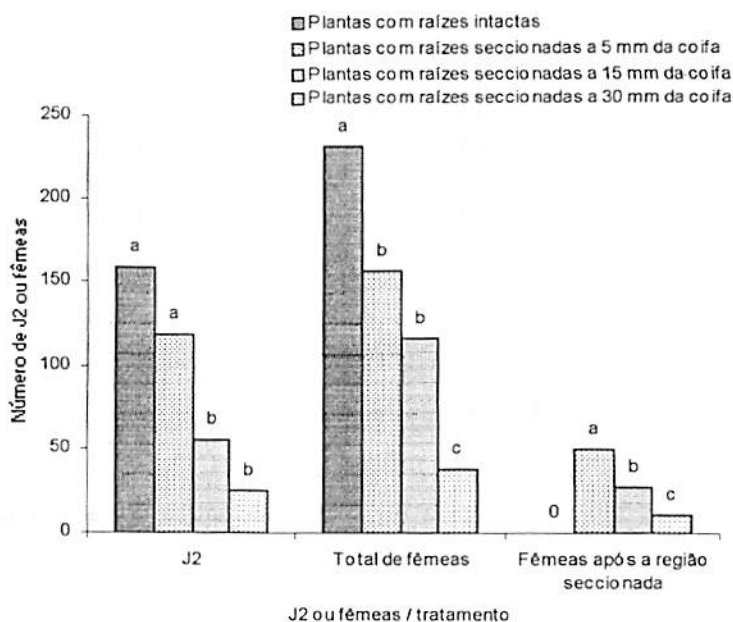


FIGURA 1- Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e de fêmeas em sistema radicular intacto de planta de soja e naqueles sistemas radiculares com as raízes seccionadas em diferentes extensões a partir da coifa. Barras seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

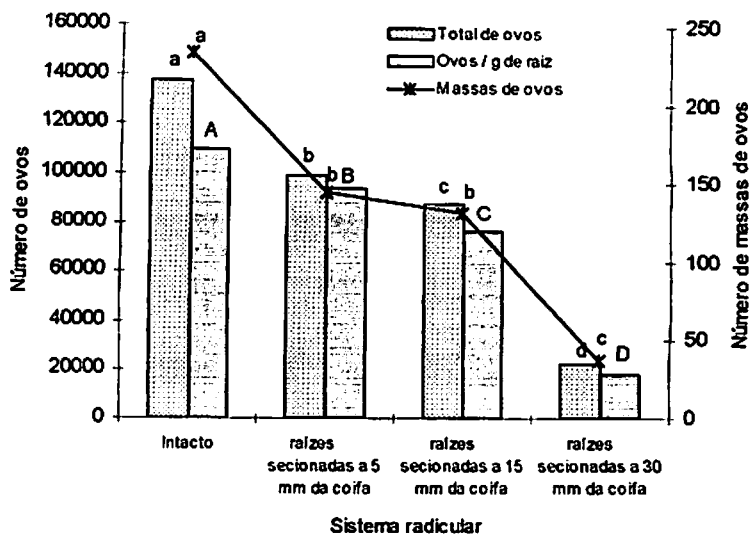


FIGURA 2- Número total de ovos de *Meloidogyne javanica*, de ovos por grama de raiz e de massas de ovos em sistema radicular intacto de planta de soja e naqueles sistemas radiculares com as raízes seccionadas em diferentes extensões a partir da coifa. Barras e linha seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Por outro lado, a atração de J2 de *M. javanica* é direcionada para a coifa ou regiões próximas dela. Assim, a ausência desses pontos de atração pode refletir na menor penetração nas raízes seccionadas. De acordo com Bird (1959) os nematóides são atraídos pela região meristemática apical das raízes e por pontos onde as raízes laterais emergem devido à ocorrência, nessas regiões, de maior exsudação radicular.

O maior seccionamento das raízes no sistema radicular também causou a remoção da região de tecidos em diferenciação, portanto restaram-se mais tecidos já diferenciados nessas raízes seccionadas, impossibilitando o J2 de induzir eficientemente o seu sítio de alimentação nesses tecidos, reduzindo assim, a população do nematóide no sistema radicular com raízes de maior

seccionamento. Segundo Wyss *et al.* (1992) e Bird & Bird (2001), na planta hospedeira o sítio de alimentação é induzido eficientemente pelo J2 de *Meloidogyne* em tecidos contendo células em diferenciação.

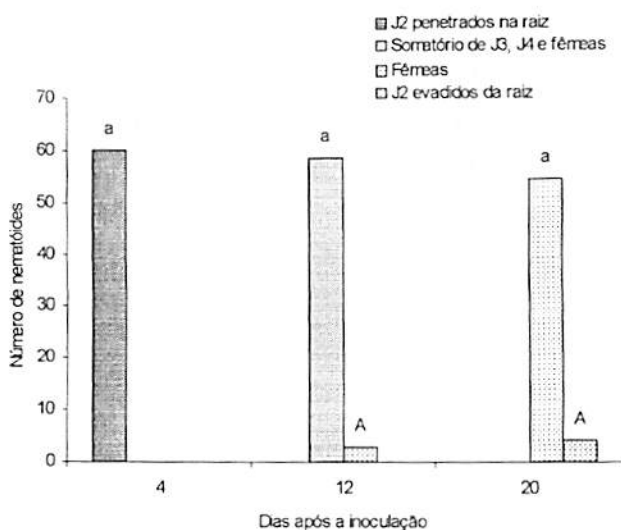


FIGURA 3- Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* penetrados na raiz aos 4 dias após a inoculação de plantas de soja, somatório do terceiro (J3), quarto (J4) estádios e fêmeas dentro da raiz aos 12 dias e fêmeas aos 20 dias. Barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas ou maiúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como as condições do ensaio e a cultivar utilizada foram favoráveis ao parasitismo, isso proporcionou baixa evasão de *M. javanica* das raízes da soja. Nessas condições, pode-se considerar a população de fêmeas proporcional ao número de J2 penetrados a partir de 4 dias da inoculação. Entretanto, esta correlação não ocorre em condições desfavoráveis, como em cultivares

resistentes, as quais normalmente não favorecem o desenvolvimento pós-penetração, induzindo maior evasão. Herman *et al.* (1991) observaram taxa de emigração de J2 de *M. incognita* nas raízes de cultivar de soja suscetível de 4%, enquanto, nas resistentes, variou entre 54 a 72%, mesmo tendo ocorrido o dobro de J2 penetrados nas resistentes em relação àqueles penetrados na suscetível. Segundo Hussey & Grundler (1998), durante penetração e migração intercelular pelo J2 de *Meloidogyne* ocorrem poucos danos aos tecidos na raiz, e isto pode minimizar a resposta de defesa de plantas resistentes, não expressando sua resistência até esta fase, o que já não ocorre quando o J2 inicia a indução do seu sítio de alimentação.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) O seccionamento das raízes de plantas de soja reduziu a penetração, o desenvolvimento e a reprodução de *M. javanica*.
- 2) Quanto maior o tamanho da secção da raiz, menor foi a penetração, o número de fêmeas, de massas de ovos, de ovos por sistema radicular e de ovos /g de raiz.
- 3) O número de J2 de *M. javanica* evadidos das raízes de soja suscetível foi baixo, chegando a 4,17% aos 20 dias após a inoculação.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIRD, A.F. The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica*, Leiden, v. 4, p. 322-335, 1959.

BIRD, D.M.; BIRD, A.F. Plant-parasitic nematodes. In: KENNEDY, M.W.; HARNETT, W. Parasitic nematodes molecular biology, biochemistry and immunology. New York: CABI, 2001. p. 139-166.

BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, v. 15, n.1, p. 142-143, 1983.

CAMPOS, V.P. et al. Manejo de nematóides em hortaliças. In: SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças. Lavras: UFLA, 2001. p.125-158.

DIEZ, J.A.; DUSENBERY, D.B. Repellent of root-knot nematodes from exudate of host roots. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 15, n. 10, p. 2445-2455, Oct. 1989.

FARIA, C.M.D.R. et al. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematóide-planta. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 11, p. 373-410, 2003.

HERMAN, M.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. *Journal of Nematology*, Lake Alfred, v. 23, n. 2, p. 155-161, 1991.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report*, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1128, 1973.

HUSSEY, R.S.; GRUNDLER, F.M.W. Nematode parasitism of plant. In: PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J. *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes*. New York: CABI, 1998. p.213-244.

KLINGLER, J. On the orientation of plant nematodes and of some other soil animals. *Nematologica*, Leiden, v. 11, n. 1, p. 4-18, 1965.



REYNOLDS, H.W.; CARTER, W.W.; O'BANNON, J.H. Symptomless resistance of alfalfa to *Meloidogyne incognita acrita*. *Journal of Nematology*, v. 2, p. 131-134, 1970.

ROCHA, F.S. Fatores biológicos e químicos que afetam a eclosão, mobilidade, mortalidade e parasitismo de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. 2003. 207p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WINDHAM, G.L.; WILLIAMS, W.P. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible corn genotypes. *Journal of Nematology*, Lake Alfred, v. 26, n. 1, p. 80-85, Mar. 1994.

WYSS, U.; GRUNDLER, F.M.W.; MÜNCH, A. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*, v. 38, p. 98, 1992.