



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



**ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA GALHA RADICULAR INDUZIDA POR
Meloidogyne javanica EM *Glycine max* L. (SOJA)**

ROBERTA MENDES ISAAC FERREIRA

Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira
(Orientador)

Uberlândia/MG
2017



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**



ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA GALHA RADICULAR INDUZIDA POR

Meloidogyne javanica EM *Glycine max L.* (SOJA)

ROBERTA MENDES ISAAC FERREIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira
(Orientador)

Uberlândia/MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383e Ferreira, Roberta Mendes Isaac, 1983
2017 Estrutura e desenvolvimento da galha radicular induzida por
Meloidogyne javanica em *Glycine max* L. (soja) / Roberta Mendes Isaac
Ferreira. - 2017.
47 p. : il.

Orientador: Denis Coelho de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.69>
Inclui bibliografia.

1. Biologia vegetal - Teses. 2. Soja - Teses. 3. Nematóide de galha -
Teses. 4. Células - Teses. I. Oliveira, Denis Coelho de. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Vegetal. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Justo ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa da Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 044 /PPGBV

Data: 21 de fevereiro de 2017

Discente: 11512BVE006 – ROBERTA MENDES ISAAC FERREIRA

Título da Dissertação: "ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA GALHA RADICULAR POR *Meloidogyne javanica* EM *Glycine max* L. (SOJA)"

Área de concentração: Biologia Vegetal

Linha de pesquisa: Processos em Biologia Vegetal

Vinculação ao Projeto de Pesquisa: Biologia, estrutura e metabolismo de galhas neotropicais

Às 8 horas do dia 21 de fevereiro do ano de 2017, no auditório do Bloco 4K – Campus Umarama, da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, composta pelos Professores Doutores: Thiago Alves Magalhães (UFVJM), Renata Carmo Oliveira (UFU) e Denis Coelho de Oliveira (UFU) orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos, o Presidente da mesa, Dr. Denis Coelho de Oliveira apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradecendo a presença do público e concedendo à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de argúcio e resposta foram estabelecidos conforme as normas do Programa.

A seguir, o Senhor Presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Finalizada a arguição, que ocorreu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Aprovada, sugerindo novo título para o trabalho (quando couber): _____

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após o cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar, foram encerrados os trabalhos às 10 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que, após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães
Univ. Fed. dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Prof. Dra. Renata Carmo Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Prof. Dr. Denis Coelho Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

AGRADECIMENTOS

É com imenso prazer que faço os agradecimentos, pois do processo seletivo, passando pela aprovação até a conclusão do Mestrado foi longo o caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo, o sentimento que fica é que poderia ter me dedicado mais, mas ao mesmo tempo um sentimento de que fiz o possível e que é mais uma etapa das muitas que virão. Aprendi muito nesses dois anos e a cada coisa que aprendo fico mais apaixonada pelo conhecimento, principalmente da Botânica. Então meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte dessa caminhada.

À Deus, pela vida, pelas bênçãos de poder realizar meus sonhos e colocar na minha vida pessoas especiais que me ajudaram tanto, a ele e Nossa Senhora agradeço por me guiar e proteger no caminho de Goiatuba a Uberlândia.

Agradeço em especial ao meu Orientador Denis Coelho de Oliveira, a quem considero um excelente profissional, pela oportunidade, paciência, e por todo ensinamento. Agradeço imensamente pela orientação durante o trabalho.

Ao Laboratório de Anatomia, Desenvolvimento Vegetal e Interações (LADEVI) e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal por financiar minha pesquisa.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de estar vinculada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, e por ceder à infraestrutura.

À minha família, irmãs e aos meus pais Uelington e Enilda agradeço imensamente pelo amor incondicional, quem eu sou devo a vocês.

Ao meu marido, Claudio Vilela que durante o mestrado foi de namorado á noivo e marido, pelo incentivo constante, pela força, paciência, companheirismo e compreensão. Você foi meu apoio do inicio ao fim.

À professora Ana Silvia, por me acolher no LAFIVE, pela ajuda e correções no trabalho e por servir como exemplo de mulher, que é mãe, esposa e ótima profissional.

Aos professores, Jimi, Ivan, Vini, Juliana, Denis, pelo imenso conhecimento adquirido nas disciplinas.

À Vinícius Kuster, pela disponibilidade, ótimas imagens e conhecimentos agregados ao meu trabalho.

À professora Letícia, por ter sido tão simpática, me acompanhado e me auxiliado na Microscopia eletrônica na UFG, e pelas correções no trabalho.

Aos meus tios, Débia e Otávio, e primos Ana Carolina, Daniela e André, pelo acolhimento em Uberlândia, e pela amizade. Podem contar sempre comigo.

Aos companheiros de turma e amigos do LADEVI e LAFIVE, especialmente as duas queridas Ana Maria, e Thais Arruda. E principalmente Vitor Martini pelo auxílio nas análises, muito obrigada pela imensa ajuda.

As minhas amigas professoras da FAFICH, por me ajudarem nos dias que não pude ir, e as professoras Kelly e Fernanda pelas dicas nas correções finais, ao meu coordenador pelo apoio, e aos meus alunos o casal Jeovana e Bruno, pela ajuda na implantação do experimento.

À secretária da pós Nívia, que me auxiliou no que era necessário, sempre muito prestativa.

Ninguém vence sozinho... Obrigada a todos que me ajudaram de alguma forma!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	06
LISTA DE TABELA.....	07
INTRODUÇÃO GERAL.....	08
REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO 1: ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA GALHA RADICULAR INDUZIDA POR <i>Meloidogyne javanica</i> EM <i>Glycine max</i> L. (SOJA)..... 16	
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Instalação do experimento.....	20
Coleta e fixação das amostras.....	20
Inclusão em historresina e análise em microscopia de transmissão.....	20
Análises histoquímicas.....	21
RESULTADOS.....	22
Caracterização morfológica, anatômica e citologia da raiz de <i>Glycine max</i>	22
Histoquímica.....	23
DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Instalação, coleta e preparação das amostras.....	31
Figura 2. Características morfológicas e anatômicas da soja inoculada e não inoculada com <i>Meloidogyne javanica</i>	31
Figura 3. Aspecto das raízes de soja com e sem a inoculação de <i>M. javanica</i>	32
Figura 4: a. Cortes transversais de raízes de soja inoculadas com <i>M. javanica</i>	32
Figura 4: b. Cortes transversais de raízes de soja inoculadas com <i>M. javanica</i>	33
Figura 5. Eletromicrografias de células presentes na raiz de soja não inoculadas e inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i>	34
Figura 6. Análises histoquímicas nas raízes de soja inoculadas e controle após 55 dias de inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i>	35

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Testes histoquímicos utilizados na interação <i>M. javanica</i> / <i>Glycine max</i> , grupos de metabolitos utilizados e metodologia.....	23
Tabela 2 - Testes histoquímicos efetuados em raízes de soja aos 55 dias.....	25
Tabela 3. Modificações anatômicas e morfológicas induzidas por <i>M. javanica</i> nas raízes de <i>Glycine max</i> inoculadas e controle (não inoculadas).....	25

INTRODUÇÃO GERAL

Galhas são consideradas um crescimento atípico de células e/ou tecidos vegetais em consequência da hiperplasia tecidual e/ou hipertrofia de células, podendo ser induzidas por uma grande variedade de organismos, como bactérias, fungos, nematoides, insetos e ácaros (MANI, 1964). Organismos galhadores podem induzir galhas em todos os órgãos vegetais sendo mais abundantes em folhas e menos frequentes em raízes. O nematoide *Meloidogyne javanica* (TREUB, 1885) é uma das espécies mais conhecidas de nematoides formadores de galhas em raízes e merece atenção devido as perdas significativas que causam em diferentes espécies vegetais cultivadas, principalmente na soja, *Glycine max* (L.).

Os nematoides galhadores são endoparasitas sedentários que induzem a formação de sítio de alimentação na região do estelo, causando modificações celulares, como o aumento da divisão e da multiplicação celular no córtex da raiz, próximo do sítio de alimentação, ocasionando as galhas, principalmente nas raízes laterais (GALBIERI; BELOT, 2016).

Os sintomas causados por nematoides do gênero *Meloidogyne* podem ser diretos, quando observados em raízes de plantas infectadas, ou reflexos, verificados na parte aérea das plantas onde nota-se tamanho desigual destas, formando reboleiras, murcha, e a diminuição na produção (FERRAZ; MONTEIRO, 1995). O sintoma direto mais característico é a formação de galhas, que aparecem quando os tecidos no entorno do corpo do nematoide reagem e sofrem hiperplasia e hipertrofia. Como resultado aparece um engrossamento típico nas raízes, que podem ser evidentes ou pouco perceptíveis, e apresentar tamanho e forma variáveis, podendo ser alongadas ou esféricas, dependendo da espécie do nematoide, da susceptibilidade da planta, e do nível de infecção elevado. Muitas vezes as galhas tendem a se unir, causando intumescimento de grande parte da raiz (ITO; TANAKA, 1993).

Paralelamente a formação das galhas ocorre formação de um sítio de alimentação necessário à sobrevivência do nematoide (PINHEIRO; PEREIRA, 2017). De acordo com Fonseca (1996), estudos histopatológicos têm sido realizados em tecidos de plantas suscetíveis e estes são direcionados para origem e formação das células nutridoras neste sítio de alimentação. Estas células são formadas em número de três a oito, em volta da região anterior do nematoide ou no ponto onde esse patógeno insere o estilete, pois tanto na indução quanto na manutenção dessas células, dependem do contínuo estímulo do

nematoide (MOURA, 1996). Assim, o estilete e as glândulas secretoras estão entre as mais notáveis adaptações dos nematoides ao parasitismo de plantas (HUSSEY, 1989; BALDWIN et al., 2004; DAVIS et al., 2004).

As secreções contém entre outros compostos, uma série de proteínas, conhecidas como proteínas efetoras, que alteram a estrutura e função das células do hospedeiro (HOGENHOUT et al., 2009) e têm papel fundamental para o sucesso do parasitismo dos fitonematoides (VANHOLME et al., 2004; DAVIS et al., 2008; ROSSO et al., 2012). Essas células quando induzidas a se transformar em tecido nutritivo diferenciado, devem ser capazes de prover um fornecimento regular de nutrientes necessários ao desenvolvimento e à reprodução do nematoide (FERRAZ, 2001).

O processo de parasitismo nas raízes pelo nematoide inicia-se após a penetração do segundo estágio juvenil (J2), quando este chega ao cilindro vascular seleciona e modifica algumas células vegetais rediferenciando-as e formando um sitio de alimentação. O nematoide injeta, por meio do estilete, secreções esofagianas no citoplasma de um pequeno grupo de células localizadas no cilindro vascular ou nas suas adjacências (FERRAZ, 2001). Essas células passam por alterações morfológicas (hipertrofia) e fisiológicas, citoplasma de aspecto denso, granuloso, associado a sucessivas divisões dos núcleos sem citocinese. Desta forma há a formação das células gigantes ou nutridoras, onde o nematoide obtém o alimento. Tais células funcionam como um grande dreno biológico, desviando o fluxo descendente dos nutrientes do floema para a alimentação do nematoide (NOE, 2010).

O primeiro sinal de formação das células gigantes é o aparecimento de várias células binucleadas, elas podem ser 100 vezes maiores que as células do parênquima vascular da raiz normal e apresentar até 100 núcleos (ABAD, 2003). Outras modificações seriam a diminuição do tamanho do vacúolo, o aumento na quantidade de organelas citoplasmáticas, principalmente mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, e o espessamento e invaginação das paredes celulares (GODDIJN et al., 1993). A formação das células gigantes representa uma das respostas mais complexas atingidas em tecidos vegetais por qualquer patógeno ou parasita (HUANG et al, 2005). Sendo interessante conhecer as fases de desenvolvimento das células gigantes, pois apresentam notável importância nos estudos histopatológicos.

Os fitonematoides são pragas importantes na maioria das culturas sendo responsáveis por perdas de produção significativas, gerando custos importantes para o seu controle. São vermes do solo, que precisam de água e de plantas hospedeiras para se desenvolver (GALBIERI; BELOT, 2016). Os nematoides do gênero *Meloidogyne*

pertencem a família Heteroderidae (FILHO et al., 1995), e são considerados importantes fitopatogenos devido a sua relevância econômica e ampla gama de plantas hospedeiras (LUC et al, 1990). As plantas infectadas por espécies desse gênero tornam se mais suscetíveis a outros fitopatogenos, ficam menos resistentes a estresses, especialmente o hídrico (MOURA, 1996), e podem afetar a produção final tanto qualitativa quanto quantitativamente (ROESE et al., 2001). Esse gênero é um dos poucos que permitem diagnóstico positivo pelo exame visual das raízes, podendo ser uma das razões por que ele parece ser o nematoide parasita de plantas mais comum (NOE, 2010).

Os fitonematoides são biotróficos, dependendo de um citoplasma vivo para a sua sobrevivência, e são equipados para localizar uma planta que seja hospedeira, e estabelecer a relação parasítica, pois possuem um sistema nervoso bem desenvolvido, e ainda glândulas esofagianas e um estilete para beneficiar sua entrada na planta e modificações nas células da mesma (FARIA et al., 2003).

Os principais fitonematoides do gênero *Meloidogyne* associados à cultura da soja no país, são as espécies, *M. incognita* (KOIFOID; WHITE, 1919) (CHITWOOD, 1949), *M. javanica* (TREUB, 1885), (CHITWOOD, 1949), (GOMES 1976; LEHMAN et al., 1977) e *M. arenaria* (NEAL, 1889), (CHITWOOD 1949). E dentre estes nematoídes o *Meloydogine javanica* ganha destaque sendo encontrado na maioria das áreas cultivadas, especialmente no Cerrado, causando perdas elevadas à produção (YORINORI, 2000). Este nematoide já foi considerado como fator limitante para expansão da cultura da soja no Brasil (LORDELLO, 1956; EMBRAPA, 1996). A infecção por estes organismos podem ocasionar perdas na produtividade em cultivares de soja suscetível, variando de 30% a 90% (ASMUS, 2001). Desta forma, conhecer e estabelecer os passos citológicos e químicos durante o desenvolvimento da infecção e formação da galha do nematoide pode fornecer subsídios para testar mecanismos de controle da infecção mais eficientes.

O ciclo de vida de *Meloidogyne* consiste de seis estádios fenológicos: ovo, quatro juvenis (J1, J2, J3, J4) e adulto (VAN DER EYCKEN et al., 1996; GHEYSEN; FENOLL, 2002), e inicia-se com um ovo, normalmente no estádio unicelular, depositado pela fêmea que se encontra no interior da raiz nesse estádio elas são brilhantes e globosas, apresentando corpo obeso (TIHOHOD, 2000). A primeira ecdise ocorre no interior do ovo, transformando-se em juvenis de segundo estádio (J2), que eclodem e começam a migrar no solo à procura de raízes de plantas que possam hospedá-los. Depois de passar por mais estágios juvenis (J3 e J4), atingem a fase adulta tornando sedentários, pois ocorre a desintegração das células musculares aumentando a largura do corpo rapidamente (FERRAZ; MENDES, 1992; MOURA, 1996; FERRAZ, 2001). As espécies de *Meloidogyne*

apresentam dimorfismo sexual, nas formas J3 e J4 as fêmeas apresentam o formato de pera, e tornam se sedentárias, sendo os machos sempre alongados, e em menor proporção que as fêmeas (LORDELLO, 1992).

A primeira barreira encontrada pelo nematoide, antes do estabelecimento da relação parasítica é a parede celular vegetal, além da força mecânica exercida pelo estilete durante seu contínuo movimento para o interior da célula, os fitonematooides secretam enzimas hidrolíticas, para degradá-la (FARIA et al., 2003). Bird (1975), verificou a presença de enzimas celulolíticas excretadas, pelo estilete de juvenis de *M. javanica*. Em contrapartida as plantas, desenvolveram inúmeros mecanismos de respostas de defesa específicos contra as várias formas de estresses. Assim estas plantas conseguem alterar o plano de desenvolvimento e contornar situações desfavoráveis, como os ataques de pragas ou patógenos, e também fatores abióticos desfavoráveis (AGRIOS, 1997). Produtos do metabolismo secundário que são produzidos durante a interação nematoide/planta, têm sido relacionados a mecanismos de resistência da planta. Estudando mecanismos de resistência de porta enxerto de seringueira a *M. javanica*, Fonseca e Jaehn, (2000), encontraram além de outras substâncias, compostos fenólicos.

A espécie em estudo é a *Glycine max* (soja) e, de acordo com Borém (1999), é uma planta herbácea, pertencente à família Fabaceae, subfamília Papilionacéas, com ciclo geralmente anual. Atualmente é considerada como uma das mais importantes oleaginosas sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial atrás apenas dos EUA. Na safra 2015/2016, a cultura ocupou uma área de 33,17 milhões de hectares (EMBRAPA, 2016) com grandes áreas, elevado nível tecnológico e alta produtividade (CONAB, 2013). Apesar desses aspectos importantes, deve se considerar que os níveis de produtividade ainda podem ser melhorados, pois há fatores diversos que o afetam como os problemas sanitários, ressaltando o ataque de fitonematooides (FERRAZ, 2001). Nesse sentido são necessários estudos que abordem a relação nematoide/soja, principalmente as alterações citológicas, histológicas e fisiológicas que se relacionam ao processo de infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; FAVERY, B., M. N.; CASTAGNONE- SERENO, P. Root- Knot nematode parasitism and host response: molecular basis a sophisticated interaction. Molecular plant pathology. [S.I], v. 4, n,4, p.217-224, 2003.

Agrios, G. N. How plants defend themselves against pathogens. In: Agrios, G.N. (Ed.) Plant pathology. 4th ed. California: Academic Press. p. 93-114, 1997.

Asmus, G. L. Danos causados à cultura da soja por nematóides do gênero Meloidogyne. In: SILVA, J. F. V. (Org.). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia. p. 39-62, 2001.

BORÉM, A. Escape Gênico. Revista de Biotecnologia, Brasília, DF. n. 10, p. 101-107. Set/Out 1999.

Bird, A. F. Symbiotic relationships between nematodes and plants. Symp. Soc. Exp. Biology. 29:351-71, 1975. BALDWIN, J. G.; NADLER, S. A.; ADAMS, B. J. Evolution of plant parasitism among nematodes. Annual Review of Phytopathology. v.42, n.1, p. 83–105, 2004.

Chitwood, B. G. Root-knot nematodes, part I. Proc. Helminth. Soc. Wash. 16: 90-104, 1949.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos – safra 2012/2013 sétimo levantamento abril 2013. Brasília: Conab. 28p, 2013.

Davis, E. L.; Hussey, R. S.; Baum, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. Trends in Parasitology, v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.01.005>

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil 1996/1997. EMBRAPA-SOJA. Londrina, 164 p. 1996.

Faria, C. M. D. R.; Salgado S. M. L.; Campos, H. D.; Resende, M. L. V.; Campos V. P.; Coimbra, J. L. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematoide-planta. Revista Annual de Patologia de Plantas. 11:373-410, 2003.

Ferraz, S.; Mendes, M. L. O nematoide das galhas. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 16, n. 172, p. 37-42, 1992.

FERRAZ, C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 168-201

Ferraz, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V. (Org.). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: Embrapa

Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, p. 15-38, 2001.

FONSECA, H. S. Reações de porta-enxertos de seringueira (*Hevea* spp.) a *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949 e histopatologia de raízes infectadas. 1996. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.

Fonseca, H. S.; Jaehn, A. Estudos dos mecanismos de resistência em raízes de porta-enxertos de seringueira inoculadas com *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira. 24:233-237, 2000.

Galbieri, R.; Belot, J. L. (Ed.). Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. Cuiabá: IMAMt. p. 11-36. (Boletim de P&D, n. 3), 2016.

Gheysen, G.; Fenoll, C. Gene expression in nematode feeding sites. Annual Review of Phytopathology, v. 40, p. 191-219, 2002.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.121201.093719>

Goddijn, O. J. M.; Lindsey, K.; Van Der Lee, F. M.; Klap, J. C. and Sijmons, P. C. Differential gene expression in nematode induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-gusA fusion constructs. Plant J. 4, 863-873, 1993.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04050863.x>

Gomes, P. A soja. Nobel, São Paulo, 152 p, 1976.

Hogenhout, S. A. et al. Emerging concepts in effector biology of plant associated organisms. Molecular Plant Microbe Interactions, Saint Paul, v. 22, n. 2, p. 115-122, Feb, 2009.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0115>

Huang, G. Z.; Dong, H.; Allen, R.; Davis, E. L.; Baum, T. J.; Hussey, R. S. Two chorismate mutase genes from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Mol. Plant Pathol [S.I], v.6, p. 23-30, 2005.

Hussey, R. S. Disease-Inducing Secretions of Plant-Parasitic Nematodes. Annual Review of Phytopathology. v. 7, n. 1, p. 123–141, 1989.

<https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001011>

Ito, M. F.; Tanaka, M. A. S. Soja - principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides. Campinas: Fundação Cargill, p. 1 – 2, 1993.

LEHMAN, P. S.; ANTONIO & K. R. B. Ocorrência de nematoides em soja nos estados de Minas Gerais, Goiás e Mato grosso. In: Reunião De Nematologia, II, Piracicaba, Trabalhos apresentados, p. 29- 32, 1977.

Lordello, L. G. E. Nematoides que parasitam a soja na região de Bauru. Bragantia, Campinas, v. 15, p. 55-63, 1956.

<https://doi.org/10.1590/S0006-87051956000100006>

LORDELO, A. I. L.; LORDELO, R. R. A. Genótipos de milho indicados para plantio em áreas infestadas por *Meloidogyne javanica*. *O Agronômico*, Campinas, v.44, n.1/3, p. 74-76, 1992.

Luc, M.; Sikora, R.A.; Bridge, J. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. London: CAB International, 1990. 648 p.

Mani, M. Ecology of plant galls. W. Junk, The Hague, p. 434, 1964.
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-6230-4>

Moura, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP, Passo Fundo, Brasil. p. 4:209-244, 1996.

Noe, J. P. Nematoides parasitas de plantas. In: Trigiano, R. N.; Windham, M. T.; Windham, A. S. Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório. Porto Alegre, RS, Brasil: Artmed. p. 83-96, 2010.

PINHEIRO, J. B; PEREIRA, R. B. Reação integrada. Disponível em:
<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/reacao-integrada>. Acesso em 10 de jan 2017.

Rosso, M. et al. Nematode effector proteins: targets and functions in plant parasitism. . In: MARTIN F, K. S. (Ed.). Effectors in plant microbe interactions. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, p.327–354, 2012.

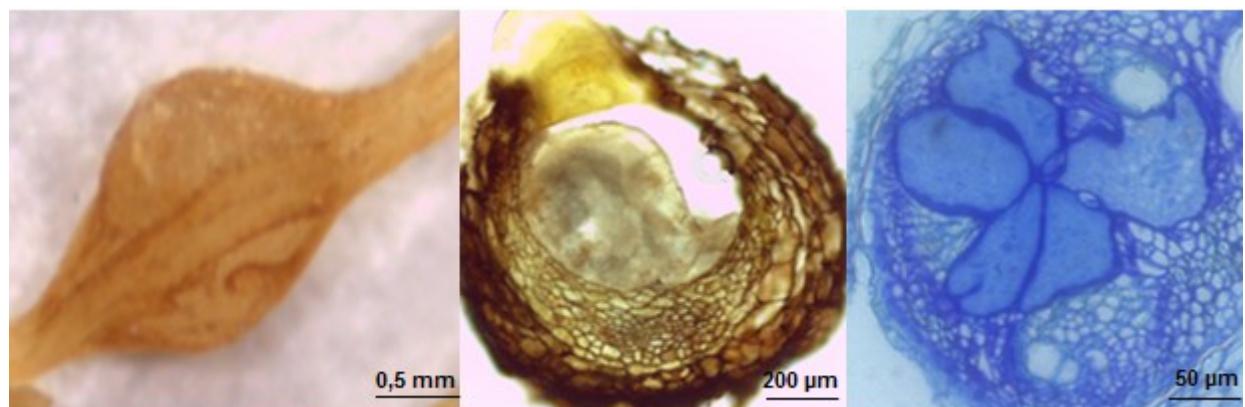
TIHOHOD, D. Nematologia agrícola aplicada. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP. 473p, 2000.

Van Der Eycken, W. et al. Molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. *Plant Journal*, v. 9, n. 1, p. 45-54, 1996.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09010045.x>

Yorinori, J. T. Riscos de surgimento de novas doenças na cultura da soja. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 1., Cuiabá. Anais... Cuiabá: Fundação MT, 2000. p. 165-169, 2000.

CAPÍTULO I

ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA GALHA RADICULAR INDUZIDA POR *Meloidogyne javanica* EM *Glycine max* L. (SOJA)



Structure and development of the *Meloidogyne javanica* induced root gall in *Glycine max* L. (soybean)

Estrutura e desenvolvimento da galha radicular induzida por *Meloidogyne javanica* em *Glycine max* L. (soja)

Roberta Mendes Isaac FERREIRA¹, Vitor MARTINI², Letícia de Almeida GONÇALVES³, Denis Coelho de OLIVEIRA⁴.

1. Mestranda do Programa de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; robertaabtg@hotmail.com. 2. Mestrando em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Uberlândia. 3. Departamento de Botânica, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. 4. Universidade Federal de Uberlândia, Laboratório de Anatomia, Desenvolvimento Vegetal e Interações, Uberlândia.

ABSTRACT: Gall-forming root-knot nematodes have been studied in several cultivated species around the world, providing subsidies for understanding the intimate relationship between parasite and the host plant. The establishment of the galling nematode depends of development of the giant cells near the inducing organism to guarantee nourishment. Therefore, species of *Meloidogyne* induce the development of a feeding site in the cortex or vascular cylinder and the nematodes are totally dependent of this site formation. In this way, we focuses on the anatomical, cytological and histochemical changes during the establishment and development of galls induced by *Meloidogyne javanica* in roots of *Glycine max*. The soybean variety used in this study was M8372 IPRO, susceptible to *M. javanica*. The seeds of *G. max* were sown in trays and then placed in tubes, where roots were sampled at different stages of development, as inoculated plants as well control plants. The samples of galls and non-galled roots were used for histological, cytological and histochemical analysis in optical and transmission electron microscopy. The galls showed different shapes and abundance in the inoculate roots by *M. javanica*. The induction of galls occurs by hypertrophy of the root cortex shortly after the initial infection process. Giant cells were formed at 18 days after nematode inoculation. These giant or nourishing cells are multinucleated, have dense cytoplasm, thick wall with invaginations, many mitochondria and small vacuoles. The anatomical sections indicated a disorganization of the cells of the cortex and vascular cylinder in relation to the uninoculated (control) root.

Keywords: Galls. Giant cells. Nematode. Soybean

RESUMO: Galhas radiculares induzidas por nematoides têm sido estudada em diversas espécies cultivadas, fornecendo subsídios para a compreensão da íntima relação entre parasita e hospedeiro. O estabelecimento do nematoide galhador passa, necessariamente, pelo processo de formação das células gigantes, que garantem a nutrição do organismo galhador. As espécies de *Meloidogyne* estabelecem um sítio de alimentação no córtex ou cilindro vascular da raiz, sendo esses organismos totalmente dependentes deste sítio de indução. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações anatômica, citológica e histoquímica durante o desenvolvimento de galhas induzidas por *Meloidogyne javanica* em raízes de *Glycine max*. A variedade de soja utilizada foi a M8372 IPRO, suscetível ao nematoide *M. javanica*. As sementes foram semeadas em bandejas e depois colocadas em tubetes, onde foram realizadas coletas de amostras radiculares em diferentes estádios de desenvolvimento, tanto de plantas inoculadas com o nematoide quanto de plantas controle. As amostras de galhas e raízes não galhadas foram utilizadas para as análises histológicas, citológicas e histoquímicas, em microscopia óptica e eletrônica. Verificou-se a presença de galhas após a inoculação de *M. javanica*, com variação na quantidade e na forma. A indução das galhas ocorre pela hipertrofia do córtex da raiz, logo após o processo inicial de infecção. Aos 18 dias após a inoculação do nematoide já é possível observar a formação de células gigantes. Estas células gigantes ou

nutridoras são multinucleadas, possuem citoplasma denso, parede espessa com invaginações, muitas mitocôndrias e pequenos vacúolos. As secções anatômicas indicaram uma desorganização das células do córtex e cilindro vascular em relação à raiz não inoculada (controle).

Palavras-chave: Galhas. Células gigantes. Nematoide. Soja.

INTRODUÇÃO

Galhas são estruturas complexas (CORNELL, 1983) e seu desenvolvimento depende da ação de um indutor que pode pertencer a diversos grupos taxonômicos podendo ser induzida pela ação alimentar, fisiologia e danos mecânicos promovidos pelo indutor (HORI, 1992). As galhas induzidas por nematoídeos são engrossamentos radiculares com tamanhos variados, onde estão alojadas de uma a dezenas de fêmeas sedentárias do nematoíde (INOMOTO; SILVA, 2011) sendo esta parte integral da raiz elas provocam alterações na anatomia radicular de diferentes espécies vegetais hospedeiras, por meio do incremento de divisões e hipertrofia celular (CARMO; SANTOS, 2008), ocorrendo especialmente à formação de células gigantes, ocasionando deformações no sistema vascular (KRUSBERG; NIELSEN, 1958; SIDDIQUI; TAYLOR, 1970 JONES; DROPPKIN, 1976; FINLEY, 1981).

Em geral as galhas são consideradas drenos e competem com outros órgãos da planta hospedeira por recursos produzidos pela fotossíntese (fotoassimilados) (HARTLEY 1999; CASTRO et al., 2012). Esta competição pelos fotoassimilados pode levar a perdas na produção de diversas plantas cultivadas, especialmente da soja (MACHADO, 2015). Considerando a importância do cultivo da soja e a necessidade do controle da infestação de nematoídeos nesta cultura, estudos estruturais e de desenvolvimento das galhas tornam-se fundamentais para compreender os passos que levam ao desenvolvimento da galha.

O processo de indução das galhas começa quando os nematoídeos galhadores penetram nos tecidos da raiz. A penetração ocorre, geralmente, próxima ao ápice radicular onde os estágios juvenis (J2) do nematoíde penetram na parede das células radiculares pela combinação de injúria física, via inserção do estilete e decomposição da parede por enzimas celulíticas e pectolíticas. Depois de penetrar, geralmente com múltiplas infecções numa mesma raiz, o tecido radicular hipertrofia e o desenvolvimento radicular cessa por um período. Após a penetração na raiz, os J2 migram entre as células do córtex na região de diferenciação celular e esta migração causa a destruição da lamela média. Então os nematoídeos se movem em direção ao cilindro vascular e os J2 se tornam imóveis. A região anterior do nematoíde na fase J2 fica imbebida na periferia do tecido vascular a nível de epiderme/pericílio e o resto do corpo fica no córtex paralelo ao eixo longitudinal da raiz (KARSSEN; MOENS, 2006).

No cilindro vascular o nematoíde induz a formação de células hipertrofiadas, com citoplasma denso, granuloso e núcleos bem evidentes, denominadas nutridoras, as quais

são essenciais à alimentação e desenvolvimento do nematoide que da forma juvenil toma a forma salsichóide, perdendo sua mobilidade e passa a se alimentar da raiz, ocorrendo o parasitismo (FERRAZ; MONTEIRO, 1995). De fato, o desenvolvimento das células nutridoras, também denominadas células gigantes, são essenciais para o estabelecimento e ciclo do nematoide nas plantas hospedeiras e sua formação não tem relação com a hipertrófia das células do córtex da raiz na formação da galha (TAYLOR; SASSER, 1978).

As plantas desenvolveram uma gama de mecanismos de defesa envolvidos na resistência ao ataque de parasitas. Estes mecanismos envolvem alterações no metabolismo hormonal, metabolismo de compostos fenólicos, produção de substâncias tóxicas, alterações dos reguladores de defesa e modificações na estrutura do tecido vegetal (FARIA et al., 2003). Nesse contexto, análises celulares e teciduais da raiz e das galhas induzidas por nematoides podem ajudar a entender os mecanismos de defesa da planta e como o galhador estimula a formação das células gigantes, típicas em galhas radiculares induzidas por nematoides. A formação das células gigantes e a hipertrófia de células parenquimáticas provocam obliteração de parte dos elementos de vaso do xilema e até a desorganização total do cilindro vascular (WANDERLEY; SANTOS, 2004), tendo implicações diretas na absorção de água e, consequentemente, de nutrientes no solo, predispondo a planta a estresses ambientais. Entretanto, mesmo com estas drásticas alterações no sistema vascular a formação das células gigantes é essencial para o estabelecimento e desenvolvimento do nematoide galhador.

Estudos histopatológicos assumem especial interesse nas interações *Meloidogyne*, sendo importante o conhecimento do processo de desenvolvimento das galhas e das células gigantes induzidas por este grupo de nematoides, bem como de suas alterações no sistema radicular e dos danos causados às culturas suscetíveis. Diante destas considerações, o estudo do sistema *Meloidogyne javanica-Glycine max*, tem por objetivos: (1) Analisar o desenvolvimento morfológico e anatômico de galhas induzidas por *M. javanica*; (2) Descrever o impacto ultra estrutural causado pelo nematoide galhador nos tecidos da raiz, especialmente durante a formação das células gigantes (3) Avaliar histoquimicamente o estresse biótico causado pelo galhador nos tecidos da galha e qual a relação dos metabólitos primários e secundários na manutenção da maquinaria celular e/ou alimentação do nematoide galhador.

MATERIAL E MÉTODOS

Instalação do experimento

O experimento foi implantado em Casa de Vegetação da FAFICH (Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas de Goiatuba), no município de Goiatuba-Go.

A variedade de soja utilizada foi M8372 IPRO®, susceptível ao nematoide *Meloidogyne javanica*. As sementes de *Glycine max* (soja) foram semeadas em bandejas contendo substrato Biomassa® (fibra de coco). Após 10 dias de emergência retirou-se as plântulas para inoculação dos nematoides nas raízes, mediante a pipetagem de 5ml, contendo na suspensão 2000 juvenis (J2) de *M. javanica*, onde foram inoculadas 50 plantas com os nematoides e outras 50 mantidas como controle, (sem a inoculação), e colocadas em tubetes (Fig. 1A) contendo solo esterilizado na proporção de 7:1 de areia/solo.

Coleta e fixação das amostras

Foram coletadas amostras das raízes (Fig. 1B) em diferentes estágios de desenvolvimento, nas plantas inoculadas e nas plantas não inoculadas (controle). As coletas foram realizadas aos 4 DAI (dias após a inoculação), aos (11, 18, 25, 32, 39, e 45)DAI. Após coletar as amostras eram medidas e pesadas a parte aérea e a raiz. Aos 55 DAI as galhas das raízes foram pesadas em balança analítica, também isoladas e contadas, para se avaliar o Índice de galhas (IG) conforme proposto por Taylor e Sasser (1978), Quadro 1.

Quadro 1. Escala de Taylor e Sasser (1978).

Grau ou nota	Reação	Número de galhas
0	Resistente	0
1	Resistente	1-2
2	Resistente	3-10
3	Susceptível	11-30
4	Susceptível	31-100
5	Susceptível	> 100

As amostras radiculares consistiram de segmentos de 0,5-1,0 cm de comprimento retirados das regiões mediana e apical. Essas amostras foram fixadas para a microscopia de luz em solução de FAA 50 (formaldeído + ácido acético + etanol 50% 1:1:18) (JOHANSEN, 1940) e para microscopia eletrônica de transmissão em solução fixadora de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) (Fig. 1C).

Inclusão em historesina e análise em microscopia de transmissão

Para preparação de lâminas permanentes e análises em microscopia de luz, o material foi desidratado em série etanólica (50, 70, 80, 90 e 100%) e, posteriormente, infiltrado em historesina Leica®. Cortes transversais dos fragmentos da galha e raiz não galhadas foram obtidos em micrótomo rotatório (Fig. 1D) e corados com azul de toluidina (FEDER; O'BRIAN et al.; 1968) em tampão fosfato pH 5,9. Seções transversais dos cortes a mão livre aos 55 dias foram fotografadas em microscópio de fluorescência, usando filtro DAPI, para visualização de ligninas.

Para as análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET) as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato (0,1 M pH 7,2), desidratado em série etanólica (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) e incluído gradualmente em resina Araldite®. Os blocos foram cortados com navalha de diamante em ultramicrótomo Reichert-Jung – Ultracut (Leica, Wetzlar, Germany), os cortes afixados em telinhas para MET (Fig. 1E), contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), e então analisados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), Jeol, JEM-2100, equipado com EDS, Thermo scientific. Centro de Microscopia da UFG (Universidade Federal de Goiás).

Análises histoquímicas

As amostras de material fresco, recém-coletadas, aos 55 dias foram seccionadas à mão livre e submetidas aos seguintes testes (Tabela 1).

Tabela 1. Testes histoquímicos utilizados na interação *M. javanica/ Glycine max*, grupos de metabolitos utilizados e metodologia.

Grupos de metabólitos		Substância/Metodologia
CARBOIDRATOS	(amido) (carboidratos redutores) (pectinas)	Lugol (Jensen, 1940) Fehling (Sass, 1951) Vermelho de rutênio (Johansen, 1940)
PROTEÍNAS	(proteínas totais)	Azul mercúrio de bromofenol (Mazia et al., 1953)
FENOIS	(fenólicos)	Cloreto de Ferro III (Johansen, 1940)
LIPÍDIOS	(lipídios)	Vermelho B Sudão IV (Pearse, 1980)
ESPÉCIES ATIVAS (ERO) DE OXIGÊNIO		DAB* (Rossetti; Bonatti, 2001)

*DAB-(3,3'-diaminobenzidina).

RESULTADOS

Caracterização morfológica, anatômica e citológica da raiz de *Glycine max*

Nas plantas controle, o comprimento da parte aérea foi em média de 24 cm, e da raiz 30 cm. Já o comprimento da parte aérea das plantas inoculadas foi de 25 cm, e da raiz 31 cm. A raiz da soja observada é pivotante apresentando uma raiz principal, raízes secundárias e terciárias (Fig. 2A). A anatomia das raízes das plantas controle apresentaram a estrutura anatômica tipicamente primária com epiderme simples e unisseriada, o córtex parenquimático (Fig. 2B) com a presença de espaços intercelulares e células maiores que as do cilindro vascular (Fig. 2B). O cilindro vascular é protostélico tetrarco, com células compactadas (Fig. 2B-C), o xilema primário com protoxilema e metaxilema bem evidentes e alternados aos feixes do floema (Fig. 2C).

Externamente as raízes parasitadas pelo nematoide, destacam se as galhas que podem estar dispostas individualmente ou em grupos (Fig. 2A^a), estas são induzidas por *Meloidogyne javanica*, e se apresentam como engrossamentos irregulares, (Fig. 2A^b). Com base na morfologia externa, aos 4 DAI não se observou diferenças entre a raiz controle e a inoculada (Fig. 3A-B). Já aos 11 DAI dos nematoides, foram observadas poucas galhas aparecendo como um leve engrossamento (Fig. 3C), após 18 dias de inoculação, as raízes apresentavam galhas com espessamento um pouco mais evidente, mas a partir de 25 dias estavam em maior número e mais visíveis (Fig. 3D- G). Sendo às vezes globulares, variar

no tamanho, e na forma (Fig. 3C-D-E-F-G), Com 55 dias a média da massa fresca das galhas era de 0,15 g, e abundância de galhas variou de 13 a 202, com uma média de 50 galhas por planta, caracterizando a como suscetível grau 4, de acordo com a escala de Taylor e Sasser (1978).

A partir das análises anatômicas da raiz de *G. max* inoculadas com *M. javanica* foi possível observar que aos 4 (Fig. 4 a. A) e 11 dias após inoculação não houveram alterações na sua estrutura anatômica. Entretanto, a partir de 18 DAI notou-se a presença de células gigantes em início de desenvolvimento (Fig. 4 a. B- C) demonstrando uma típica reação de susceptibilidade, com alterações celulares como, citoplasma denso e granuloso e parede celular espessa.

As raízes apresentavam após 25 (DAI) o cilindro vascular anatomicamente desorganizado, com células gigantes bem diferenciadas (Fig. 4a. D-E) sendo possível observar a presença da fêmea do nematoide (Fig. 4a. F). Aos 32, e 39 (DAI) as células gigantes multinucleadas (Fig. 4b. A) estavam visualmente maiores e em maior quantidade (Fig. 4b. A-B). Observa-se a fêmea do nematoide em contato com o sitio de alimentação aos 39 e 44 dias (Fig. 4b B-C.).

A análise ultra estrutural permitiu observar que ocorrem diferenças entre as células gigantes e as células radiculares das plantas controle. Nas raízes não inoculadas, o córtex é preenchido por células parenquimáticas que possuem parede celular delgada e citoplasma parietal (Figura. 5A-B). Observa-se também o cilindro vascular e elementos de vaso do xilema (Fig. 5C). Enquanto as células gigantes apresentam um aumento na quantidade de plastídios (Fig. 5D), e de organelas principalmente mitocôndrias (Fig. 5D-E) presentes em grande quantidade nessas células. Pode se notar nas células gigantes a substituição de um grande vacúolo central por vários outros menores, ou seja, o vacúolo torna-se fragmentado (Fig. 5F-G) e há a proliferação de organelas incluindo, retículo endoplasmático e dictiosomos (Fig. 5J). Em algumas células gigantes a parede celular apresentava modificações formando inúmeras invaginações (Fig. 5I), típicas de células de transferência, voltadas para a face interna.

Histoquímica

Os testes histoquímicos (Tabela 2), realizados nas raízes inoculadas e nas raízes controle mostraram à presença de grânulos de amido nas raízes controle (Fig. 6A-B), porém nas raízes de plantas parasitadas estava em maior quantidade no cilindro vascular e próximo as células gigantes (Fig. 6 E-F). Nas raízes controle a quantidade de ROS, é maior no córtex que no cilindro vascular (Fig. 6C-D). Gotículas lipídicas foram detectadas em

pequenas quantidades dispersas na raiz inoculada e no nematoide (Fig. 6H- I). Compostos fenólicos, flavonoides e pectinas não foram encontrados nas raízes controle e inoculadas.

Tabela 2 - Testes histoquímicos efetuados em raízes de soja aos 55 dias.

SUBSTÂNCIA		CONTROLE	INOCULADA
CARBOIDRATOS	(amido)	+	+
	(carboidratos redutores)	-	-
	(pectinas)	-	-
PROTEÍNAS	(proteínas totais)	+	+
FENOIS	(fenólicos)	-	-
LIPÍDIOS	(flavonoide)	-	-
	(lipídios)	-	+
ROS	(ROS)	+	+

Abreviações: (-) reação negativa; (+) reação positiva.

DISCUSSÃO

As raízes de *G. max* atacadas por nematoides galhadores, induzem a modificações anatômicas e morfológicas sendo possível observar as seguintes modificações (Tabela 3).

Tabela 3. Modificações anatômicas e morfológicas induzidas por *M. javanica* nas raízes de *Glycine max* inoculadas e controle (não inoculadas).

	Inoculadas	Controle
Galhas	4 DAI não encontradas; 11 DAI leve intumescimento; 18 dias já podiam ser observadas e aos 25 DAI encontradas maiores e em maior quantidade.	Ausente.
Células gigantes	4 e 11 DAI não observadas; 18 DAI em formação; 25 DAI já causam desorganização do cilindro vascular; 32, 39, 45 dias eram maiores e em maior quantidade.	Ausente.
Núcleo	(Células gigantes) Multinucleada, com formato por	Geralmente um

	vezes ameboide.	núcleo.
Organelas	(Células gigantes) Aumento da quantidade de organelas como Reticulo endoplasmático, Golgi, principalmente mitocôndrias encontradas em grande quantidade.	Quantidade normal de organelas
Parede celular	(Células gigantes) Espessa e com projeções labirínticas.	Típica de uma parede celular primária.
Vacúolos	(Células gigantes) Fragmentado.	Um vacúolo geralmente central.

A soja, *Glycine max*, é uma planta herbácea, com caule ramoso, híspido, seu tamanho varia entre 80 e 150 cm (NUNES, 2016). O comprimento médio das plantas neste experimento foi de 24 cm e parte aérea, sendo que a variedade utilizada tem altura média é de 76 cm (MONSOY, 2016). Entretanto esta diferença ocorre porque o ciclo dessa variedade ser em média 120 dias, no experimento elas foram retiradas aos 55 dias. De acordo com as medias encontradas não houve diferenças consideráveis no comprimento da parte aérea e comprimento da raiz entre a soja controle e inoculada. O comprimento das raízes encontrado aos 55 dias foi de 30 cm, porém o comprimento pode chegar a até 1,80 m, apesar da maior parte delas se encontrarem a 15 cm de profundidade segundo Nunes (2016), e ainda de acordo com esse autor o sistema radicular da soja é constituído por eixo principal e várias raízes secundárias.

As raízes de *G. max* são atacadas por nematoides galhadores, fitopatogenos que induzem galhas em diversas cultivares. Estas galhas se desenvolvem devido à hipertrofia das células do sistema de revestimento e córtex da raiz e, de forma simultânea. Porém em um processo distinto, ocorre hipertrofia e hiperplasia das células do cilindro vascular. O estímulo do nematoide induz, no sistema vascular, a formação de células que funcionam como sítios de alimentação, as células gigantes (FERRAZ, 2001; ALMEIDA ENGLER et al.; 2016). Assim, raízes de *G. max* atacadas por *M. javanica* (nematoide galhador) formam galhas devido a hipertrofia das células do córtex, e células gigantes através de rediferenciação principalmente de células do cilindro vascular. O nematoide fêmea permanece no interior da galha de *G. max* onde as células gigantes mantém seu suprimento energético. Acredita-se que o gatilho inicial para formação destas células

venha das secreções das glândulas esofagianas do nematoide (FERRAZ, 2001), que altera o ciclo celular da hospedeira levando a várias divisões do núcleo sem citocinese (ALMEIDA ENGLER et al., 2016).

As células gigantes são essenciais ao desenvolvimento e a reprodução do nematoide, entretanto, as galhas são consideradas apenas bons indicadores da extensão das reações hiperplástica e hipertróficas dos tecidos vasculares afetados pelas secreções (FERRAZ, 2001), não sendo essenciais ao sucesso da relação parásito-hospedeiro.

As galhas formadas pelo *M. javanica* nas raízes da soja são bem visíveis assim como observado por Hussey (1985) em várias espécies e Ferraz; Brown (2016) em feijoeiro, aboboreira, pepino, quiabeiro, tomateiro, fumo, pêssegoiro onde estas apresentam várias galhas de grandes dimensões. Pode se notar que as galhas radiculares apresentam tamanho e forma distintas, segundo Ferraz, (2001) elas podem variar de acordo com a espécie de *Meloidogyne*, do nível de infecção observado, e da planta hospedeira envolvida (FERRAZ, 2001). Em contrapartida, raízes de milho e sorgo parasitadas por *Meloidogyne* têm poucas galhas evidentes e estas aparecem como um leve engrossamento, dificultando sua verificação em campo (ASMUS et al., 2000). Em alguns casos não ocorre à formação das galhas, em outros, aparecem galhas maiores em resposta ao ataque de vários nematoides no mesmo sítio de indução. Por mais que não seja uma regra, pode existir uma correlação entre o tamanho do sistema radicular da planta infestada e a taxa de multiplicação do nematoide (HUSSEY; JANSSEN, 2002).

Em *G. max*, aos 11 dias após inoculação do nematoide, ocorreu um leve intumescimento da raiz, caracterizando o início de formação da galha, entretanto, não é observado a diferenciação das células gigantes. Em galhas induzidas por *M. Javanica* em seringueira foram encontradas células gigantes no cilindro vascular aos 20 dias após inoculação do nematoide (FONSECA, 2003). Neste estudo as galhas induzidas por *M. javanica* em *G. max* apresentaram células gigantes aos 18 dias após inoculação. Westerich et al. (2012) no seu estudo com tomate mostrou que o sítio de alimentação induzido por *M. enterolobii* foi observado a partir de 17 dias após inoculado, e o cilindro vascular era constituído por poucas células gigantes. Desta forma, pode se dizer que as células gigantes são formadas em geral entre 18 a 20 dias após a inoculação, independente da espécie hospedeira e do indutor dentro do gênero *Meloydogine*. A formação das células gigantes é controlada em parte pela reorganização do citoesqueleto das células do cilindro vascular e, consequentemente, reorganização das microfibrilas de celulose na parede celular (ALMEIDA ENGLER et al., 2004). Esta reorganização possibilita a hipertrofia das células para formação das células gigantes (FAVERY et al., 2016).

Os cortes anatômicos da raiz de soja controle mostrou sua estrutura primária, tetrarca, isto é, com quatro polos de xilema (DROPKIN; NELSON, 1960). Células do córtex com espaços intercelulares, maiores que do cilindro vascular, e epiderme com uma camada de células, como observado por Voltan et al. (2000). No entanto, nossos resultados mostram que a formação das células gigantes aos 18 dias após inoculação desorganiza o sistema vascular no sítio de indução, podendo ocorrer supressão total ou parcial de polos do protoxilema. Essas alterações mecânicas no sistema radicular de plantas atacadas por *Meloidogyne* spp., são irreversíveis e, pelo menos em parte, responsáveis pelos severos danos causados por esses nematoides (ALMEIDA; ENGLER et al., 2016; FAVERY et al., 2016).

Aos 32 dias após inoculação mais células gigantes puderam ser observadas. Estas células são multinucleadas, com núcleos em formato ameboide ou lobado, formato encontrado também por Dawes (1969), e Fonseca et al. (2003) em seringueira parasitadas por *M. javanica* e *M. exígua*. Os núcleos das células gigantes de galhas em raízes de batata-doce infectadas por *Meloidogyne* variavam em tamanho, forma e, por vezes, eram 100 vezes maiores do que os núcleos de células vizinhas (KRUSBERG; NIELSEN, 1958).

Notou – se também uma grande quantidade de organelas, especialmente mitocôndrias. A presença de grande quantidade de mitocôndrias, especialmente próximas à parede celular com invaginações, corrobora os resultados encontrados por Gunning, (1977) em células gigantes induzidas por *M. exígua*. Grande quantidade desta organela é um indicativo de períodos de maior entrada de solutos orgânicos e outros elementos nas células gigantes. Elas são uma das principais organelas produtoras de ERO sendo responsável pela geração da maior parte de radicais livres observadas em células animais e de tecidos vegetais não-fotossintéticos, de acordo com Galina, (2006). Durante a respiração, moléculas de glicose são processadas e geram energia, que é armazenada em compostos chamados de ATP, nesse processo também são formados os radicais livres, derivados do gás oxigênio que é consumido na respiração (GALINA, 2006). As mitocôndrias variam de tamanho e de forma, dependendo de sua origem e de seu estado metabólico (VOET et al., 2002). Nas células gigantes também houve proliferação do Golgi, plastídios, ribossomos e retículo endoplasmático, relatado também por Vieira et al., 2013; Berg et al., 2008; Sobczak et al., 2011.

Nas células gigantes induzidas por *M. javanica* em *G. max* pode se observar a substituição de um grande vacúolo central por vários outros menores, assim como relatado por Bird (1961), Davis et al. (2004) e Abad et al. (2009), por Westerich et al. (2012) em

células gigantes na raiz de tomateiro inoculadas com *M. enterolobii*, e Fonseca et al. (2003) em células gigantes induzidas por *M. javanica* em seringueira.

Aos 39 e 44 dias após inoculação observou-se que a fêmea do nematoide estava em contato direto com o sítio de alimentação. De acordo com Silva et al. (1990) a presença de cinco a nove células gigantes é considerado o ideal para o desenvolvimento e nutrição do nematoide. A indução e a manutenção das células gigantes dependem de um estímulo contínuo do nematoide, sem este a célula atrofia, sendo assim as células gigantes são formadas em volta da região anterior do nematoide como mostrado neste estudo, ou no ponto onde ele insere o estilete bucal (REDDIGARI et al., 1985).

Pode se notar que algumas células gigantes em *G. max* apresentavam a parede celular com modificações, formando invaginações voltadas para o lume celular, resultados também observado por alguns autores como Berg et al, 2008; Sobczak et al., 2011; Vieira et al., 2013. Estas invaginações e protuberâncias na parede celular teriam a função de aumentar a área da superfície da membrana para a absorção de soluto (GOLINOWSKI et al., 1996; HUSSEY; GRUNDLER, 1998), favorecendo assim a alimentação de nematoides. De acordo com Berg et al. (2008), a parede de células gigantes com engrossamentos labirínticos aumenta o fluxo de substâncias entre as células de alimentação (JONES; NORTHCOTE, 1972; JONES; GUNNING, 1976). Os solutos derivados do floema seriam importados para as células gigantes, através do plasmodesmo, simplasticamente (VIEIRA et al., 2013; HOFMANN et al., 2010; VIEIRA et al., 2012) ou por meio de a transportes ativos (apoplasto), justificando a grande quantidade de mitocôndrias próximas a parede. A parede celular mais espessa, citoplasma denso e por vezes granuloso, e plastídios, foram encontrados também por Westerich (2010) nos sítios de alimentação de *Meloidogyne mayaguensis* em tomateiros "Magnet" e "Helper M". Em resposta a ação química das enzimas secretadas por espécies de *Meloidogyne* ocorre uma continua divisão celular sem que ocorram as divisões citoplasmáticas (ENDO, 1987), assim formando células de maior tamanho, parede espessa, alta atividade metabólica e citoplasma denso (JONES, 1981; HUSSEY; WILLIAMSON, 1998).

As plantas reagem ao ataque de nematoides galhadores por meio de mecanismos de defesa que são usualmente complexos e tem como base a ação combinada de diversos fatores (FARIA et al.; 2003). Como exemplo, o acúmulo de compostos fenólicos nas células parenquimáticas corticais e vasculares sugerem que estes atuam na defesa das plantas ao ataque dos nematoides (VALETTE et al., 1998). Em galhas induzidas por *M. javanica* em *G. max* não foram detectados compostos fenólicos, mas Fonseca; Jaehn (2000),

observaram um acúmulo de compostos fenólicos ao redor do nematoide e, em alguns casos ao redor da célula gigante induzidas por *M. javanica* em seringueiras.

As respostas de defesa do hospedeiro aos nematoides incluem a reação de hipersensibilidade (HR) e ativação de rotas metabólicas que levam a produção de diversos metabólitos estruturais, incluindo calose e lignina (FARIA et al., 2003; FAVERY et al., 2016; ALMEIDA ENGLER et al., 2016). De fato, há um aumento na lignificação de células ao redor do sítio de alimentação do nematoide galhador em *G. max*, indicando uma resposta inicial mais não efetiva de defesa. A inibição de proteinases e consequente aumento na quantidade de proteínas totais também é uma resposta de defesa da hospedeira (FARIA et al., 2003). Entretanto, em *G. max* análises histoquímica não detectaram de forma intensa proteínas nos tecidos das galhas. Este seria um indicativo que as proteinases não foram inibidas, compatível com o grau de susceptibilidade dessa cultivar. Notou-se a presença de gotículas de lipídios no tecido no nematoide e tecido próximos a ele, a energia necessária ao nematoide acumulada durante o desenvolvimento embrionário, deve ser suficiente para o juvenil eclodir e cumprir, com sucesso, etapas do processo de parasitismo, podendo explicar a presença de gotículas lipídicas no nematoide. Larvas infectivas não se alimentam até o estabelecimento do parasitismo e suas reservas energéticas são gotículas de lipídios armazenadas na porção posterior do seu corpo, suficientes para a manutenção por aproximadamente duas semanas (ABAD et al., 2003). De acordo com Van Gundy et al. (1967) se o J2 (juvenil) gastar mais de 50% das reservas lipídicas corporais, na movimentação em busca de hospedeiro por exemplo, não terá mais capacidade de infectar a planta.

CONCLUSÃO

As galhas radiculares resultantes da interação entre *Meloidogyne javanica* e *Glycine max* apresentaram formato e tamanhos variáveis. Nesta interação ocorreu a indução de um sítio bem definido de alimentação, formado por um grupo de células diferenciadas próximas a região anterior do nematoide, sendo este sítio de alimentação responsável para nutrir e suportar o desenvolvimento do nematoide até o estádio de fêmea madura, este conjunto de células provocam a desorganização completa do cilindro vascular podendo interferir nos transportes do xilema e floema. As células gigantes apresentam-se multinucleadas, com citoplasma denso, numerosas organelas citoplasmáticas, principalmente mitocôndrias, vacúolo fragmentado e uma parede invaginante.

Nos testes histoquímicos realizados notou- se a presença de amido, que pode auxiliar na alimentação do nematoide e manutenção da maquinaria celular da galha, as gotículas lipídicas encontradas principalmente no nematoide, pode estar envolvida no processo de parasitismo. Espécies reativas de oxigênio (ERO) foram encontradas na galha e no tecido sadio. Compostos fenólicos geralmente encontrados durante essa interação na defesa da planta não foram observados neste estudo, nem flavonoides, e pectinas.

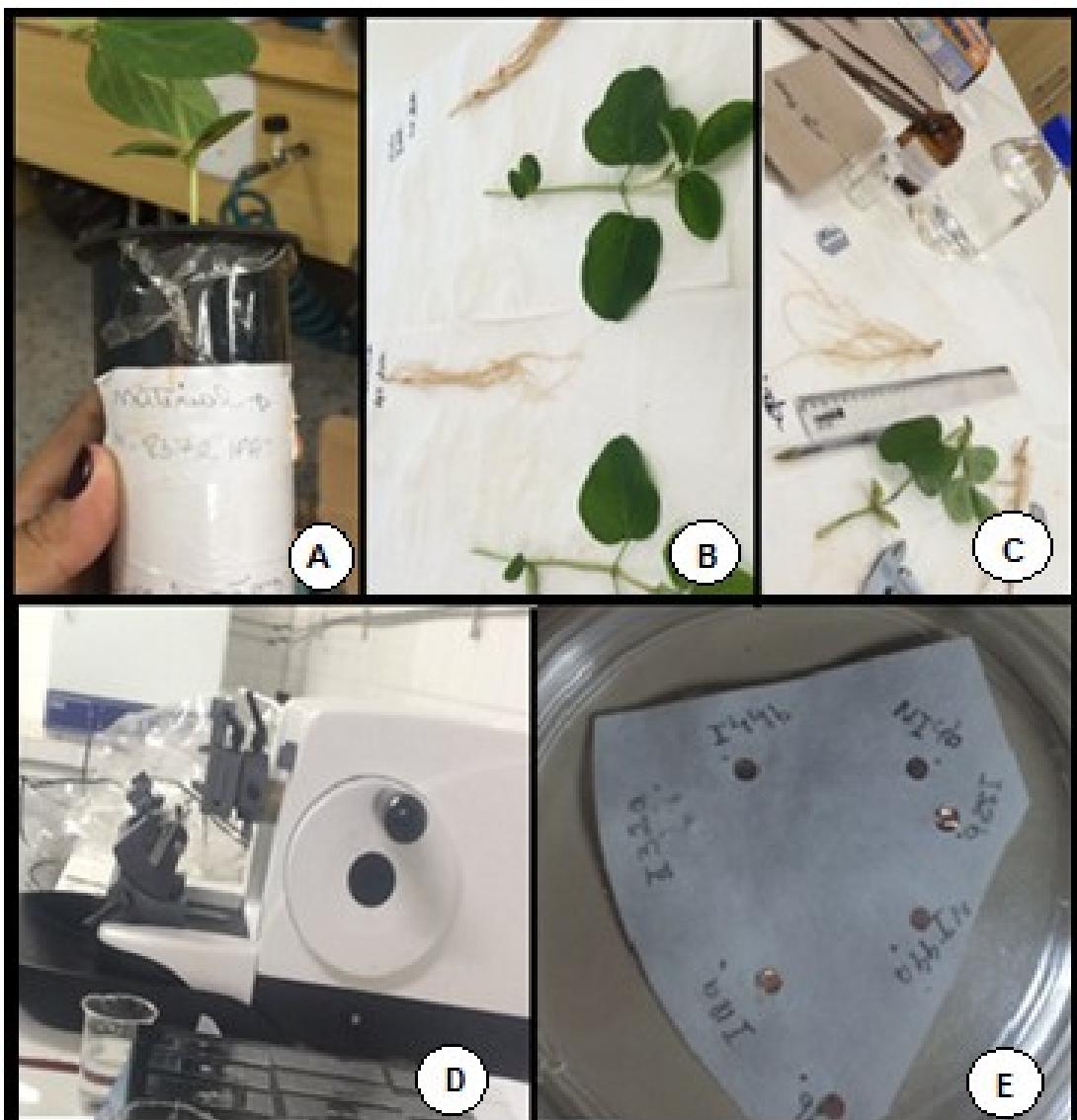


Figura 1. Instalação, coleta e preparação das amostras. (A) Soja em tubete, 4 dias após ser inoculada com *M. javanica*. (B) Coleta da amostra, após ser retirada do vaso, raiz lavada e separação da parte aérea. (C) Raiz sendo medida, e retiradas as amostras. (D) Micrótomo, lâminas após ser feito o corte no micrótomo. (E) Material a ser analisado na microscopia eletrônica.

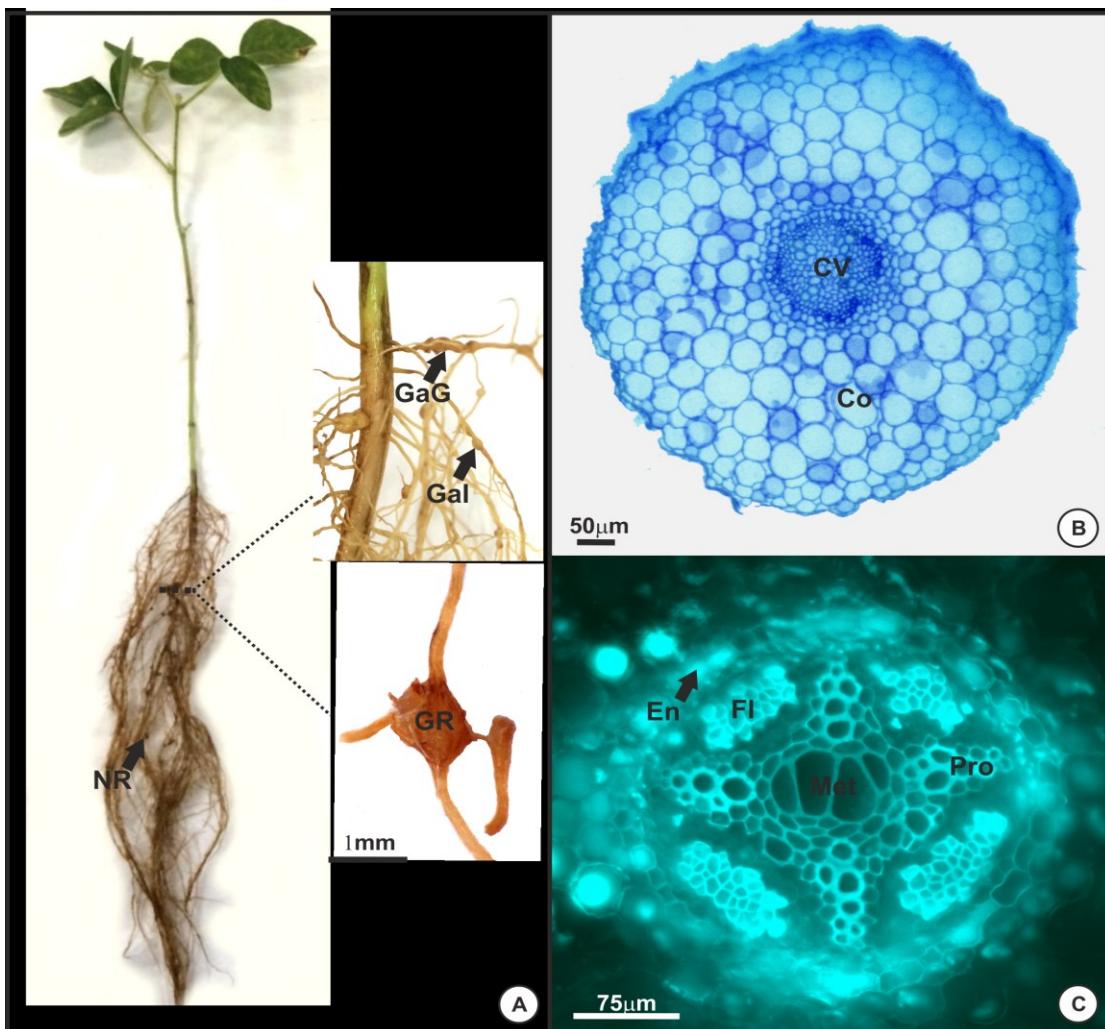


Figura 2. Características morfológicas e anatômicas da soja inoculada e não inoculada com *Meloidogyne javanica*. (A) Raiz e parte aérea. (A^a) Detalhe da raiz com galhas em grupos ou individuais. (A^b) Detalhe de uma galha. (B) Anatomia da raiz da planta controle aos 18 dias, evidenciando epiderme, córtex parenquimático e cilindro vascular tetrarco. (C) Detalhe do cilindro vascular mostrando o metaxilema, protoxilema e floema da planta controle aos 55 dias. Legenda: Co- Córortex, CV- Cilindro vascular, Ep- Epiderme, En- Endoderme, Fl- Floema, GaG- Grupo de galhas, Gal- Galhas individuais, Met- Metaxilema, NR- Nódulos radiculares por bactérias. Pro- Protoxilema.

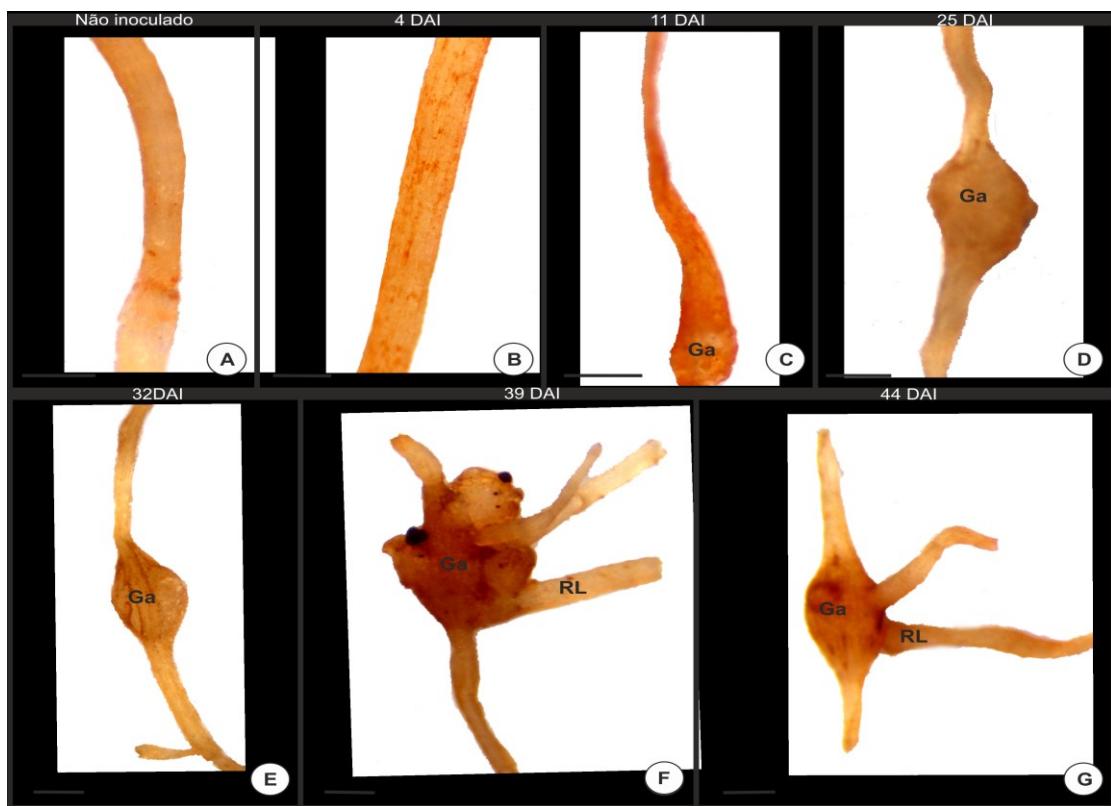


Figura 3. Aspecto das raízes de soja sem e com a inoculação de *Meloidogyne javanica*. (A) Não inoculada (controle). (B) Após quatro dias de inoculação, ausência de galhas. (C) Após 11 dias de inoculação evidenciando leve engrossamento. (D-E-F-G) Galhas em diferentes estádios de desenvolvimento, com formas e tamanhos variados. Barra: 0,5 mm. Legenda: No= Nô ou galha, RL= Raiz lateral.

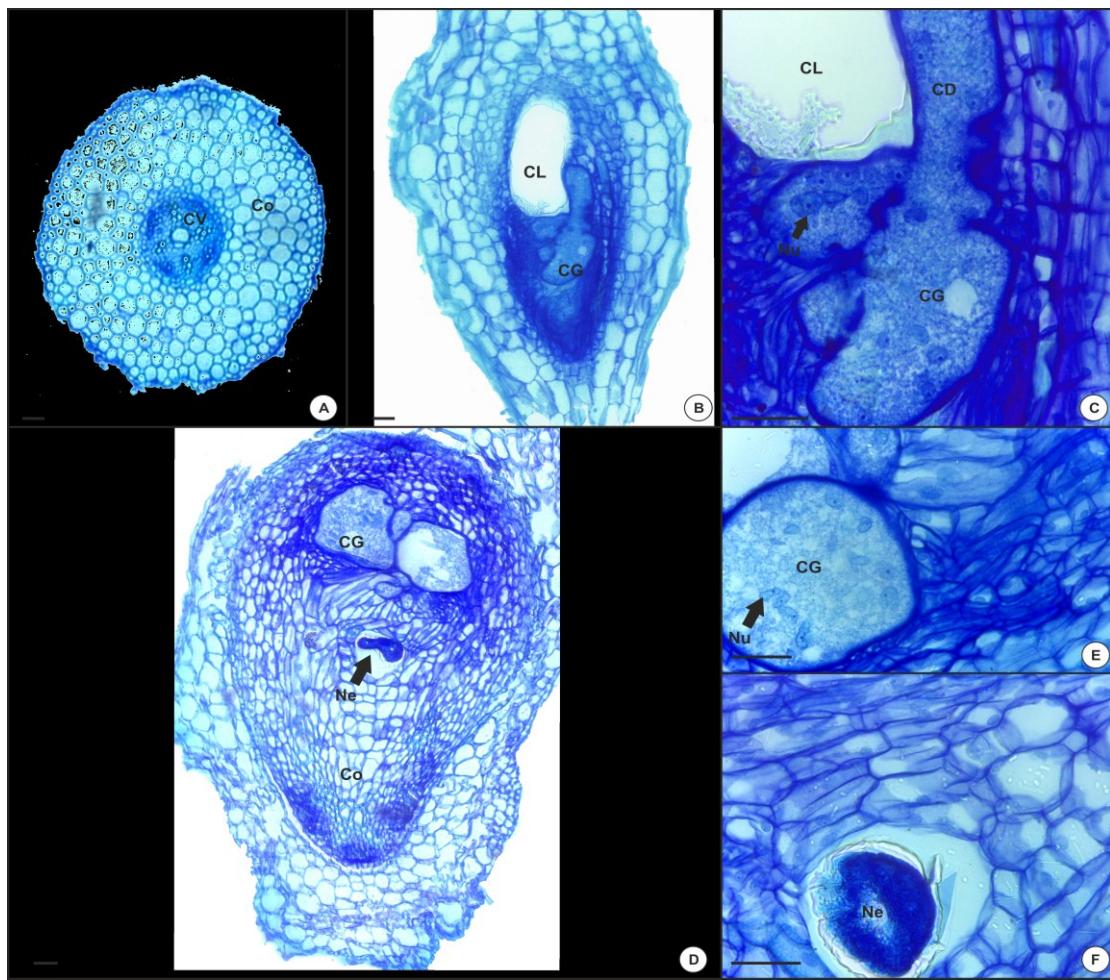


Figura 4: a. Cortes transversais de raízes de soja inoculadas com *Meloidogyne javanica*. (A) Aos 4 (DAI) a raiz sem a formação das células gigantes. (B-C) Após 18 (DAI), formação das células gigantes com citoplasma denso e multinucleado. (D-F) Aos 25 (DAI), evidenciando duas células gigantes e a formação de outras, mostrando também a fêmea do nematoide em corte transversal. Barra: A - F=50 μm . Legenda: Co = CórTEX, CD- Citoplasma denso, CL= Câmara larval, Cv = Cilindro vascular, CG = Célula gigante, Ne= Nematoide, Nu = núcleo.

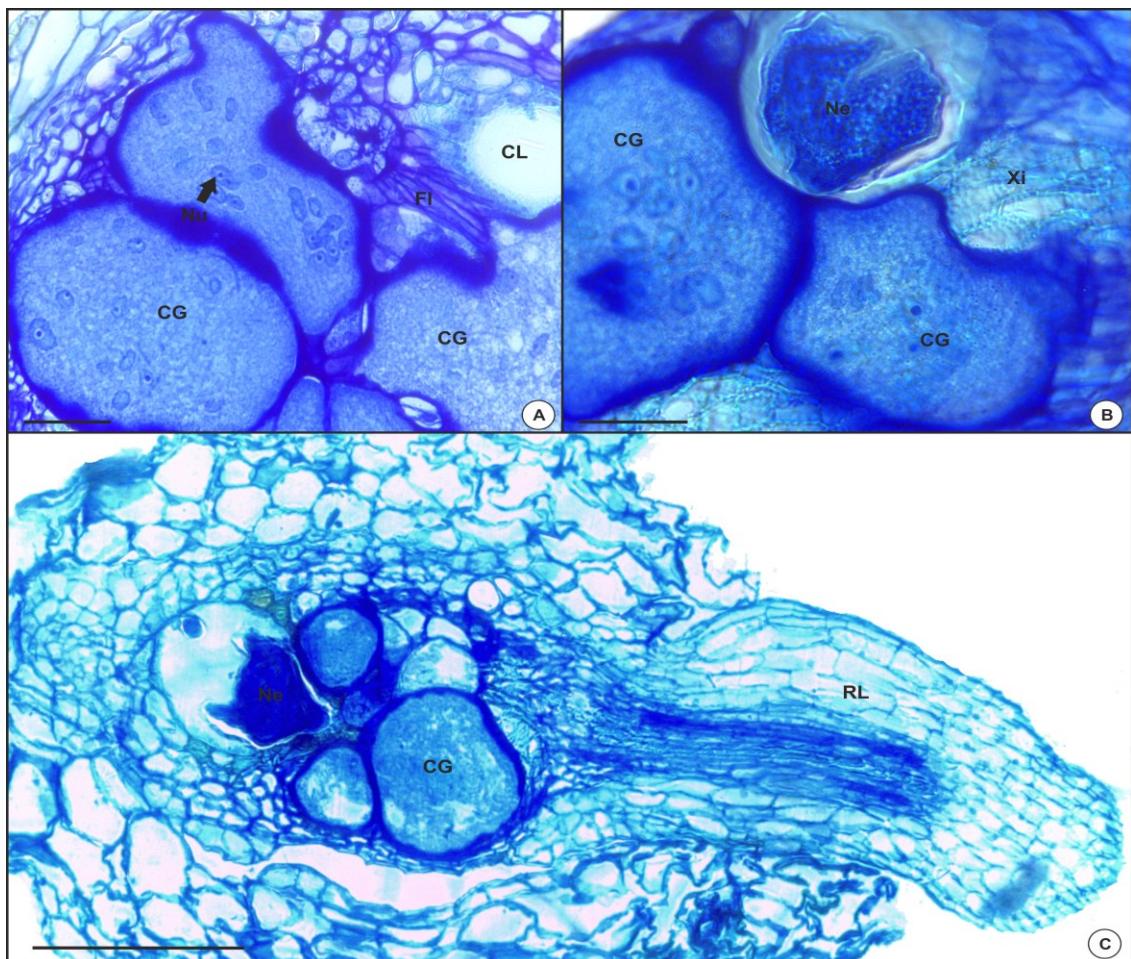


Figura 4: b. Cortes transversais de raízes de soja inoculadas com *M. javanica*. (A) Aos 32 (DAI), 5 células gigantes bem desenvolvidas, e uma severa desorganização do cilindro vascular, as células gigantes em detalhe mostram paredes espessas e vários núcleos. (B-C) Fêmea do nematoide em contato com o sítio de alimentação. Barra: A - C=50 µm. Legenda: CD- citoplasma denso, CG = Célula gigante, FL= Floema, Nu = Núcleo, RL= Raiz lateral, Xi= Xilema.

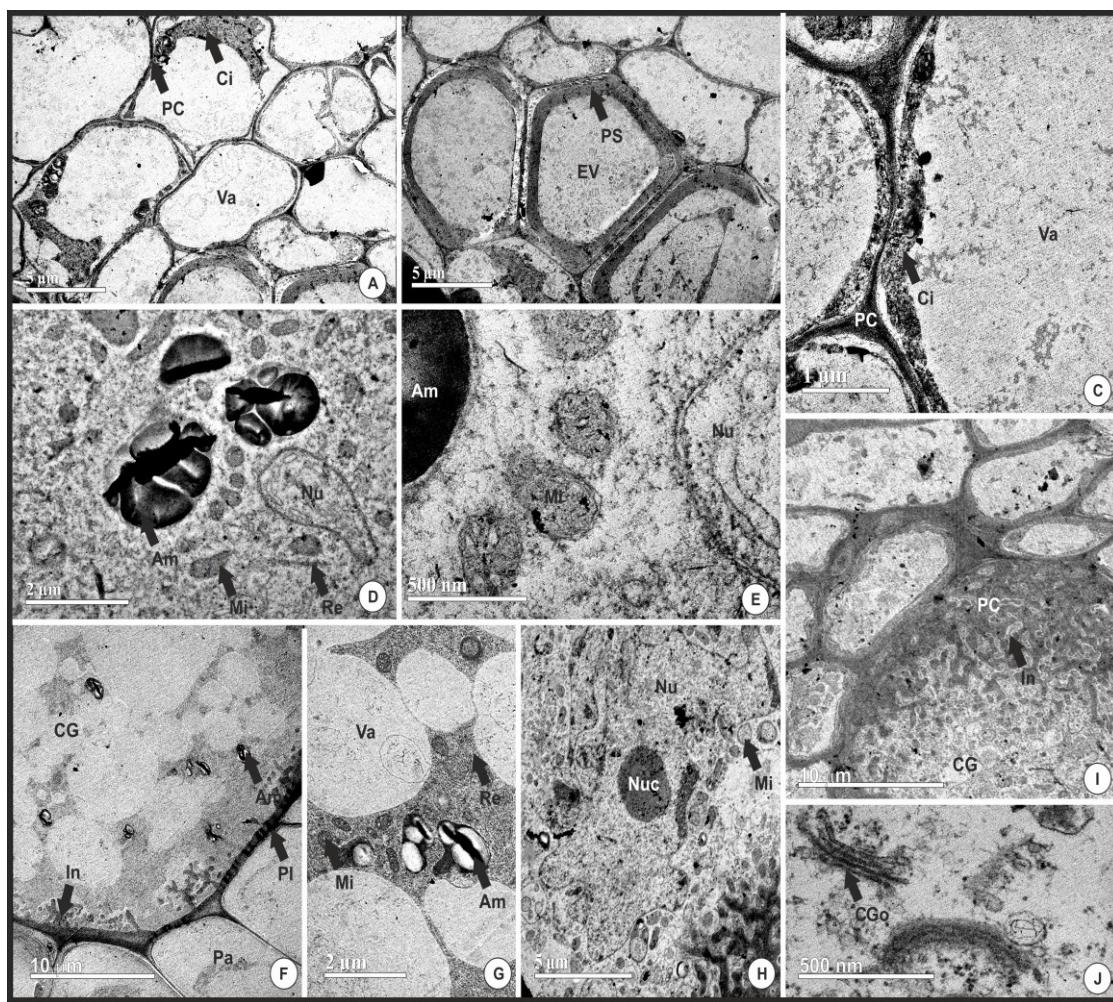


Figura 5. Eletromicrografias de células presentes na raiz de soja não inoculadas e inoculadas com *Meloidogyne javanica*. (A-C) Células das raízes não inoculadas. (A) Células parenquimáticas do córtex da raiz controle evidenciando paredes delgadas. (B) Cilindro vascular com detalhe os elemento de vaso do xilema. (C) Detalhe de uma célula típica do córtex mostrando citoplasma parietal. (D-J). Células gigantes das raízes inoculadas. (D) Amiloplastos, citoplasma denso e mitocôndrias. (E) Detalhe das mitocôndrias. (F) Vacúolo fragmentado. (G) Detalhe dos vacúolos, amiloplasto e mitocôndrias. (H) Núcleo com formato ameboide e nucléolo evidente. (I) Parede celular labiríntica. (J) Dictiossomos. Legenda: Am- Amiloplasto, CD- citoplasma Denso, Cl- Citoplasma, CG- Células gigantes, CGo- Complexo de golgi, Mi- mitocôndrias, Nu- núcleo, Nuc- Nucléolo, PC- Parede celular. PI- Parede com invaginações, Nu- núcleo, Nuc- nucléolo, Va- Vacúolo.

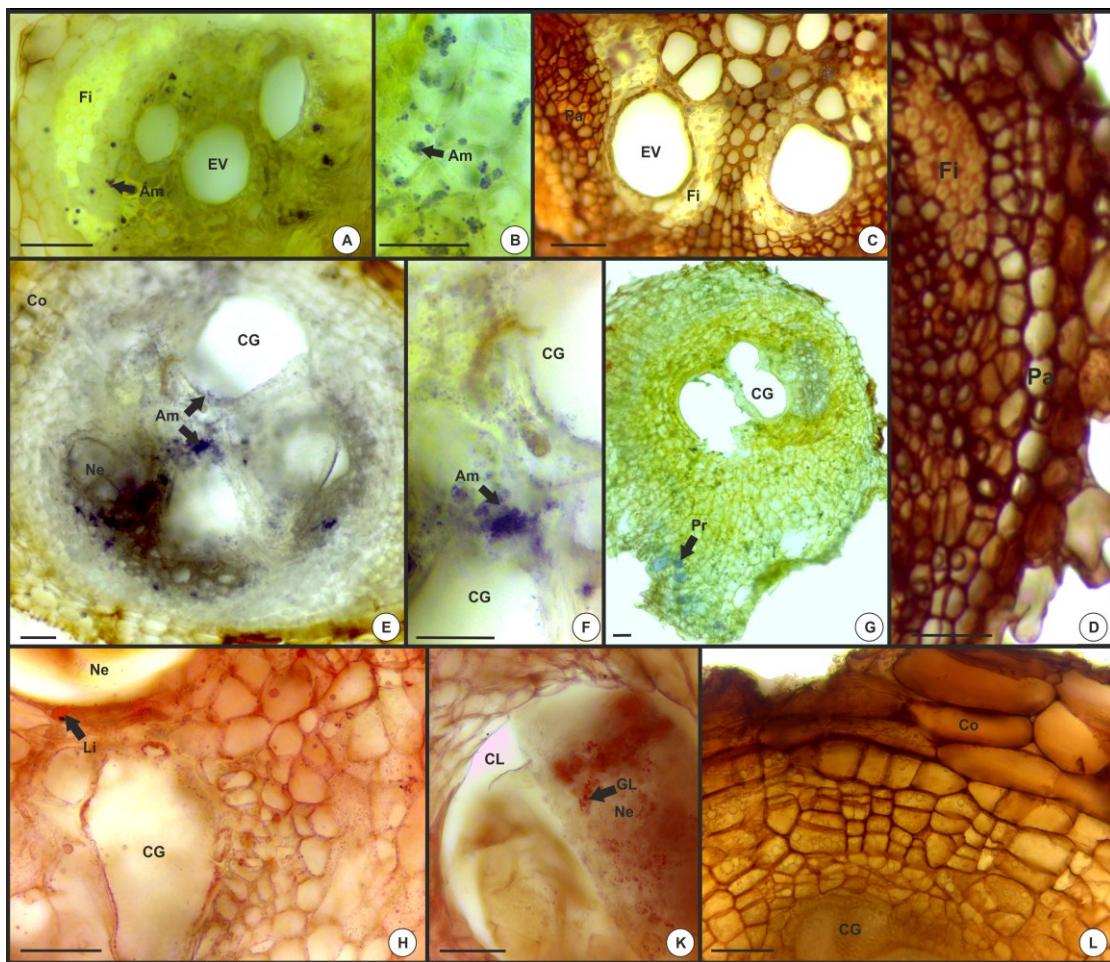


Figura 6. Análises histoquímicas nas raízes de soja inoculadas e controle após 55 dias (DAI) com *M. javanica*. (A- B) Raiz controle, grânulos de amido no cilindro vascular, e detalhe de grânulos de amido no córtex. (C) Cilindro vascular da raiz controle, ROS. D. Raiz inoculada, ROS. (E-F) Raiz Inoculada, grânulos de amido no cilindro vascular. (G) Raiz inoculada, proteínas. (H). Inoculada, gotículas de lipídios. (H- I) Raiz inoculada, presença de gotículas de lipídios no nematoide e regiões próximas. (J) Inoculada, ROS. Legenda: Am- Amido, CG- Células gigantes, CL- Câmara larval, Co- Córte, EV- Elemento de vaso, Fi- Floema, Ne- Nematoide.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad, P.; Fahey, B.; Rosso, M. N.; Castagnone-Sereno, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, London, v. 4, n. 4, p. 217-224, 2003.

<https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00170.x>

Berg, R. H.; Fester, T.; Taylor, C. G. "Development of the root-knot nematode feeding cell," in *Plant Cell Monographs, Cell Biology of Plant Nematode Parasitism* eds BERG, R. H.; TAYLOR, C. G., editors. (Berlin Heidelberg: Springer) 115–152, 2008.

Bird, A. F. The ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant-cell. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11. 701–715, 1961.

<https://doi.org/10.1083/jcb.11.3.701>

Carmo, D. B; Santos, M. A; Hospedabilidade de plantas infestantes aos fitonematóides Meloidogyne javanica e Pratylenchus brachyurus. VII Encontro interno. XII Seminário de Iniciação Científica, UFU, 2008.

Davis, E. L.; Hussey, R. S.; Baum, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology*, v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.01.005>

De Almeida Engler, J.; De Vleesschauwer, V.; Burssens S.; Celenza, J. L. J.; Inzé D.; Van Montagu, M.; et al. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell* 11 793–808, 1999.

<https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.793>

De ALMEIDA ENGLER, J.; KINTDT, T.; GOVERSE, A.; HAEGEMAM, A.; WALMERDAM, S.;

Dropkin, V. H. & P. E. Nelson. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology*, 50: 442-447, 1960.

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*. Society of Nematologists, Hyattsville (MD) EUA. p. 196-201, 1987.

Faria, C. M. D. R.; Salgado S. M. L.; Campos, H. D.; Resende, M. L. V.; Campos V. P. COIMBRA, J. L. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematoide-planta. *Revista Annual de Patologia de Plantas*. 11:373-410, 2003.

Fahey, B.; Quentin, M.; Jaubert-Possamai, S.; Abad, P. Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. *J. Insect Physiol.* 84, 60–69, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.013>

Ferraz, L. C. C. B. As meloidogínoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F.

V. (Org.). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 15-38.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. L.C.C. B. Ferraz e D. J. F. Brown (Orgs.). Manaus: NORMA E DITORA, 251 p. II, 2016.

Finley, A. M. Histopathology of *Meloidogyne chitwoodi* on Russet Burbank Potato. *Journal of Nematology*, v. 13, n. 4, p. 486-491, 1981.

Fonseca, H. S.; Ferraz, L. C. C. B; Machado, S. R. Caracterização do vacuoma de células gigantes induzidas por espécies de *Meloidogyne* em raízes de seringueira 'RRIM 600'. *Nematologia Brasileira*, 27(2): 193-198, 2003.

Fonseca, H. S.; Jaehn, A. Estudos dos mecanismos de resistência em raízes de porta-enxertos de seringueira inoculadas com *M. javanica*. *Nematologia Brasileira*. 24:233-237, 2000.

Golinowski, W.; Grundler, F. M. W.; Sobczak M. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* 194 103–116, 1996.

<https://doi.org/10.1007/BF01273172>

GUNNING, B. E. S. Transfer cells and their role in transport of solutes in plants. *Scientific prog.* Oxford, 64: 539-568, 1977.

Hofmann, J.; Banora, M. Y.; De Almeida-Engler, J.; Grundler, F. M. W. The role of callose deposition along plasmodesmata in nematode feeding sites. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23 549–557, 2010.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0549>

Hussey, R. S, Grundler, F. M. W. "Nematode parasitism of plants," in *The Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant-Parasitic Nematodes* eds Perry R. N., Wright D. J., editors (New York, NY: CABI International) 213–243, 1998.

Hussey, R. S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: Sasser, J.N.; Carter, C.C. (Eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne: biology and control*. Raleigh: North Carolina State University. p. 143-153, 1985.

Hussey, R. S.; Janssen, G. J. W. Root-Knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J. L.; Cook, R.; Bridge, J. (Eds). *Plant resistance to parasitic nematodes*. Wallingford, Oxon, Reino Unido, Oxon: CAB International, p. 43-70, 2002.

<https://doi.org/10.1079/9780851994666.0043>

Hussey, R. S.; Williamson, V. M. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G.A.; IITA, G.L. *Annual Report and Research Highlights*. Internaciona Institute of Tropical Agriculture, p. 56-57, 1998.

Johansen, D. A. Plant microtechnique. New York: McGraw- Hill, 1940. 523p.

Jones, M. G. K. Host cell responses to endoparasites nematode attack. Structure and function of giant cells and syncytia. Annals of applied Biology. v.97, p. 353-372, 1981.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1981.tb05122.x>

Jones, M. G. K., Northcote D. H. Nematode-induced syncytium – a multinucleate transfer cell. J. Cell Sci. 10 789–809, 1972a.

Jones, M. G. K.; Gunning B. E. S. Transfer Cells And Nematode Induced Giant Cells In Helianthemum. Protoplasma. 87 273–279, 1976.
<https://doi.org/10.1007/BF01623973>

Jones, M. G. K.; Dropkin, V. H. Scanning electron microscopy of nematode induced giant transfer cell. Cytobios, v. 5, p. 149-161, 1976.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27:137-138, 1965.

Karsen, G.; Moens, M. Root-knot nematodes. In: Perry, R. N.; Moens, M. (Eds.). Plant nematology. Wallingford, UK: CAB International, p. 59-90, 2006.
<https://doi.org/10.1079/9781845930561.0059>

Krusberg, L. R.; Nielsen, L. W. Pathogenesis of root-knot nematodes to the Porto Rico variety of sweet potato. Phytopathology. St. Paul, v.48, p.30-39, 1958.

MACHADO, A, C, Z. Nematoides devastam lavouras de soja, 2015. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/nematoides-devastam-lavouras-de-soja>> Acesso em 20/10/2016.

Mani, M. S. Ecology of plant galls. Dr. W. Junk Publ., The Hague, 1964.
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-6230-4>

Mazia D.; Brewer, P. A.; Alfert, M. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. Biological Bulletins, v.104, Numero p.57- 67, 1953.

MONSOY. Variedades Monsoy M8372 IPRO. 2016. Disponível em:
<http://www.monsoy.com.br/variedades_monsoy/m8372-ipro/>. Acesso em: 09 de jan de 2017.

NUNES, J. L. S. Características da soja (Glycine max). 2016. Disponível em:
<<http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/caracteristicas.aspx>>. Acesso em: 11 de jan de 2017.

O'Brien, T. P.; McCully, M. E. The study of plant structure principles and select methods. Melbourne: Termarcarphi Pty, 45p, 1981.

Pearse, A. G. E. Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology. 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingston, 439 p, 1981.

Reddigari, S. R.; Sundermann, C. A.; Hussey, R. S. Isolation of subcellular granules from second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* 17 (4):482-8, 1985.

Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17:208–212, 1963.

<https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>

Rossetti S, Bonatti P. M. In situ histochemical monitoring of ozone- and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:433–442, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01250-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01250-5)

SASS, J. E. Botanical microtechnique (2nd. ed.) Ames, Iowa State College Press, 228 p, 1951.

<https://doi.org/10.5962/bhl.title.5706>

Siddiqui, I. A.; Taylor, D. P. Histopathogenesis of galls induced by *Meloidogyne naasi* in wheat roots. *Journal of Nematology*, Jay, v.2, n.3, p.239-247, 1970.

SOBCZAK, M.; GOLINOWSKI, W. "Cyst nematodes and syncytia," in Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. eds Jones J., Fenoll C., Gheysen G., editors. (Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V.) 61–82, 2011.

https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_4

Silva, G. S.; Ferraz, S.; Santos, J. M. Histopatologia de raízes de crotalária parasitadas por *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.15, n.1, p.46-48, 1990.

Taylor, A. L.; Sasser, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.). Raleigh: North Carolina State University Graphics. 111p, 1978.

Van Gundy, S. D.; Bird, A. F.; Wallace, H. R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology*, St. Paul, v.57, n.6, p.559-571, 1967

Valette, C.; Andary, C.; Geiger, J. P.; Sarah, J. L.; Nicole, M. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the Burrowing nematode *Radopholus similis*. *Phytopathology*, 88: 1141-1148, 1998.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1141>

Voet, D.; Voet, J. G; Pratt, C. W. Fundamentos de bioquímica. Artmed, Porto Alegre, 2002.

Vieira, P.; Escudero, C.; Rodiuc, N.; Boruc, J.; Russinova, E.; Glab, N.; et al. Ectopic expression of Kip-related proteins restrains root-knot nematode-feeding site expansion. *New Phytol.* 199 505–509, 2013.

<https://doi.org/10.1111/nph.12255>

Vieira, P.; Engler, G.; de Almeida Engler, J. Whole-mount confocal imaging of nuclei in giant feeding-cells induced by root-knot nematodes in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 195 488–496, 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04175.x>

Wanderley, M. J. A.; Santos, J. M. Resistance of sweet potato cultivars to *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, n. 4, p. 437-440, 2004.

<https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000400014>

Westerich, J. N; Rodella R. A; Rosa J. M. O; Wilcken S. R. S. Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. *Summa Phytopathologica*. 38: 192-197, 2012
<https://doi.org/10.1590/S0100-54052012000300002>

Considerações finais

Os estudos do desenvolvimento das células gigantes e suas alterações na anatomia radicular de hospedeiros suscetíveis são importantes para a compreensão do mecanismo de parasitismo dos nematoides, auxiliando na colaboração da escolha de plantas a serem utilizadas no manejo de populações de nematoides e na documentação das alterações dos tecidos de raízes dessas variedades. Esta dissertação é importante para auxiliar na compreensão das interações nematoide-planta e os passos que levam a formação de células gigantes e das galhas. Várias questões surgiram no final deste estudo e uma nova linha de pesquisa para uma tese de doutorado poderia surgir como continuação dos meus estudos, analisando, por exemplo, como ocorre o processo de formação de células gigantes em diferentes variedades de soja susceptível, resistente, moderadamente resistente. Poderia se avaliar também, como ocorrem às modificações no córtex que levam a formação das galhas, se a quantidade de galhas correlaciona com a multiplicação do nematoide, e se as galhas teriam alguma funcionalidade, além de ajudar na diagnose. Testes histoquímicos também seriam importantes, e precisariam ser feitos em mais cortes, para um melhor entendimento dessa complexa relação nematoide-planta.

