

ALTERAÇÕES ANATÔMICAS EM RAÍZES DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) PARASITADAS POR *MELOIDOGYNE JAVANICA*

G. L. Asmus,^{1,4} L. C. C. B. Ferraz^{2,4} e B. Appezzato-da-Glória^{3,4}

EMBRAPA, CPAO, 79804-970, Dourados, MS, Brasil,¹ Universidade de São Paulo, ESALQ, Setor de Zoologia Agrícola, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil² e Universidade de São Paulo, ESALQ, Departamento de Ciências Biológicas, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil,³ bolsistas do CNPq.⁴

RESUMO

Asmus, G. L., L. C. C. B. Ferraz e B. Appezzato-da-Glória. 2000. Alterações anatômicas em raízes de milho (*Zea mays* L.) parasitadas por *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 30:33-39.

O milho inclui-se entre as principais espécies vegetais utilizadas em programas de rotação de culturas para o controle de fitonematóides. No Brasil, por muitos anos, os cultivares e híbridos comerciais foram considerados genericamente como resistentes aos nematóides de galhas, tendo a sua inclusão nas estratégias de controle de *Meloidogyne incognita* e principalmente de *M. javanica* se tornado quase obrigatória. Atualmente, no entanto, sabe-se que muitos genótipos são na verdade hospedeiros tolerantes a *M. javanica*, possibilitando o desenvolvimento e a reprodução do nematóide nas raízes, mas sem mostrar sintomas evidentes do parasitismo sob condição de campo. Visando melhor conhecimento das alterações anatômicas induzidas em milho por *M. javanica*, conduziu-se estudo sob condições de casa de vegetação e laboratório. Plântulas do híbrido BR 106 foram inoculadas com 10 000 juvenis de segundo estágio (J₂) e conduzidas em casa de vegetação por 60 dias. Ao final desse período, fragmentos de raízes mostrando leves engrossamentos ou galhas típicas foram processados para estudo histológico ao microscópio óptico. Verificou-se a presença de células gigantes multinucleadas associadas ao nematóide em todas as raízes analisadas, restritas ao parênquima vascular. Mesmo contendo várias fêmeas maduras e massas de ovos em seus tecidos, as galhas formadas eram no geral inconspícuas, situando-se próximas a extremidade apical das raízes. Por vezes, células do parênquima cortical apresentaram-se hipertrofiadas. A presença das células nutridoras na região estelar e a hipertrofia de células do parênquima provocaram a obliteração de parte dos elementos de vaso do xilema e uma desorganização do cilindro vascular. Nas células gigantes multinucleadas, detectou-se elevado conteúdo protéico bem como paredes espessadas por substâncias pécticas.

Palavras-chave: histopatologia, *Meloidogyne javanica*, milho, nematóide de galhas.

ABSTRACT

Asmus, G. L., L. C. C. B. Ferraz, and B. Appezzato da Glória. 2000. Anatomical changes in corn (*Zea mays* L.) roots caused by *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 30:33-39.

The use of corn as a rotation crop in integrated programs for controlling plant-parasitic nematodes has been widely recommended. In Brazil, where most of the commercial varieties and hybrids have been rated as resistant to root-knot nematodes for many years, its inclusion in cropping sequence strategies for the control of *Meloidogyne incognita* and mainly *M. javanica* became almost obligatory. At present, however, it is known that many genotypes are actually tolerant hosts for *M. javanica*, allowing the nematode to develop and reproduce in the roots, without causing root galls or plant growth reduction. A greenhouse/laboratory study was carried out to increase our knowledge of the anatomical changes induced by *M. javanica* in corn roots. Corn hybrid BR 106 (a suitable host) seedlings were individually inoculated with 10 000 second-stage juveniles and maintained in a greenhouse. After 60 days, slightly swollen and galled root pieces (1-3 cm long) were processed for light microscopy histological studies. Typical multinucleated giant cells limited to the vascular tissue were observed in association with *M. javanica* in all infected roots. Even with several mature females and egg masses embedded in their tissues, most root galls formed were rather inconspicuous, and fre-

quently occurred close to the root apex. In some cases cortical parenchyma cells were hypertrophied. The presence of giant cells and hypertrophied parenchyma cells in the stele region obliterated part of the xylem vessels causing disruption and disorganization of the vascular cylinder. Staining techniques allowed the detection of a high protein content in the giant cells as well as a deposition of pectic substances in their thickened walls.

Key words: Corn, histopathology, *Meloidogyne javanica*, root-knot nematodes.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) foi e continua sendo utilizado internacionalmente em programas de rotação de culturas objetivando o controle de fitonematóides, em especial dos nematóides de galhas, do gênero *Meloidogyne* Göldi. Parte dos relatos pertinentes ao assunto já foi antes sumariada na literatura (Johnson, 1985; Raymond, 1985). Nos Estados Unidos, seu emprego data da década de 1950, visando principalmente *M. hapla* Chitwood (Sasser, 1954), mas também *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood, espécie para a qual já se conheciam, à época, genótipos resistentes (Nelson, 1957; Dropkin, 1959). A partir dos anos 70, embora persistisse a recomendação de uso, passou-se a destacar (Baldwin e Barker, 1970b; Johnson, 1975; 1985; Windham e Williams, 1988) o fato de que certos híbridos na verdade atuavam como hospedeiros tolerantes a *M. incognita*, *M. arenaria* (Neal) Chitwood ou *M. javanica* (Treub.) Chitwood, e não resistentes, possibilitando o desenvolvimento e a reprodução dos parasitos nas áreas infestadas. No Brasil, trabalhos nessa linha de investigação, visando a caracterização das reações de genótipos de milho em função da capacidade reprodutiva dos nematóides nas raízes, tornaram-se também freqüentes (Asmus e Andrade, 1997; Brito e Antonio, 1989; Guimarães Filho, 1993; Lordello *et al.*, 1989), principalmente em relação a *M. javanica*, espécie considerada tão importante quanto *M. incognita* no que se refere

à patogenicidade, mas de controle mais difícil e complexo no caso de várias culturas de grande interesse econômico, como a da soja por exemplo.

Diferentemente do que ocorre nas associações entre muitas plantas cultivadas e espécies de *Meloidogyne*, em que as galhas são bem visíveis a olho nu (Hussey, 1985), nas raízes de milho parasitadas observam-se, no geral, apenas leves engrossamentos e poucas galhas evidentes, que dificultam a verificação da meloidoginose no campo por produtores rurais e mesmo por técnicos fitossanitaristas. Os estudos histopatológicos assumem, portanto, especial interesse nas interações *Meloidogyne* vs. milho e, nesse particular, raros relatos a respeito, referindo-se a *M. incognita* (Baldwin e Barker, 1970a) ou *M. hapla* (Ogbuji, 1976), foram encontrados na literatura.

Em vista do exposto, desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo de estudar as alterações anatômicas em raízes de milho decorrentes do parasitismo por *M. javanica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de milho do híbrido BR 106, previamente caracterizado (Asmus e Andrade, 1997) como hospedeiro muito favorável a *M. javanica*, foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (0,5%) e semeadas em copos de plástico contendo 500 mL de uma mistura de solo + areia lavada (resultando num substrato com 16% de argila, 6% de silte e 78%

de areia), tratada com brometo de metila (150mL/m³). Aos 10 dias após a emergência, as plantas foram inoculadas com 5 ml de uma suspensão contendo 2 000 juvenis de segundo estágio (J₂)/mL, depositada em dois orifícios de 2 cm de profundidade, distantes cerca de 1 cm do colo das plantas. As plantas foram então mantidas em casa de vegetação, regadas e adubadas sempre que necessário, até a data da coleta.

Como inóculo, foi utilizada uma população obtida de cultura de soja na região de Dourados, MS, e mantida em sistema radicular de tomateiro 'Rutgers' cultivado em casa de vegetação. Massas de ovos do nematóide foram coradas com Floxina B (15mg/L) por 20 minutos (Taylor e Sasser, 1978) e colocadas em Funil de Baermann modificado, a 28°C, para a eclosão dos juvenis, que foram utilizados na inoculação das plantas. Um grupo de plantas não inoculadas foi igualmente mantido.

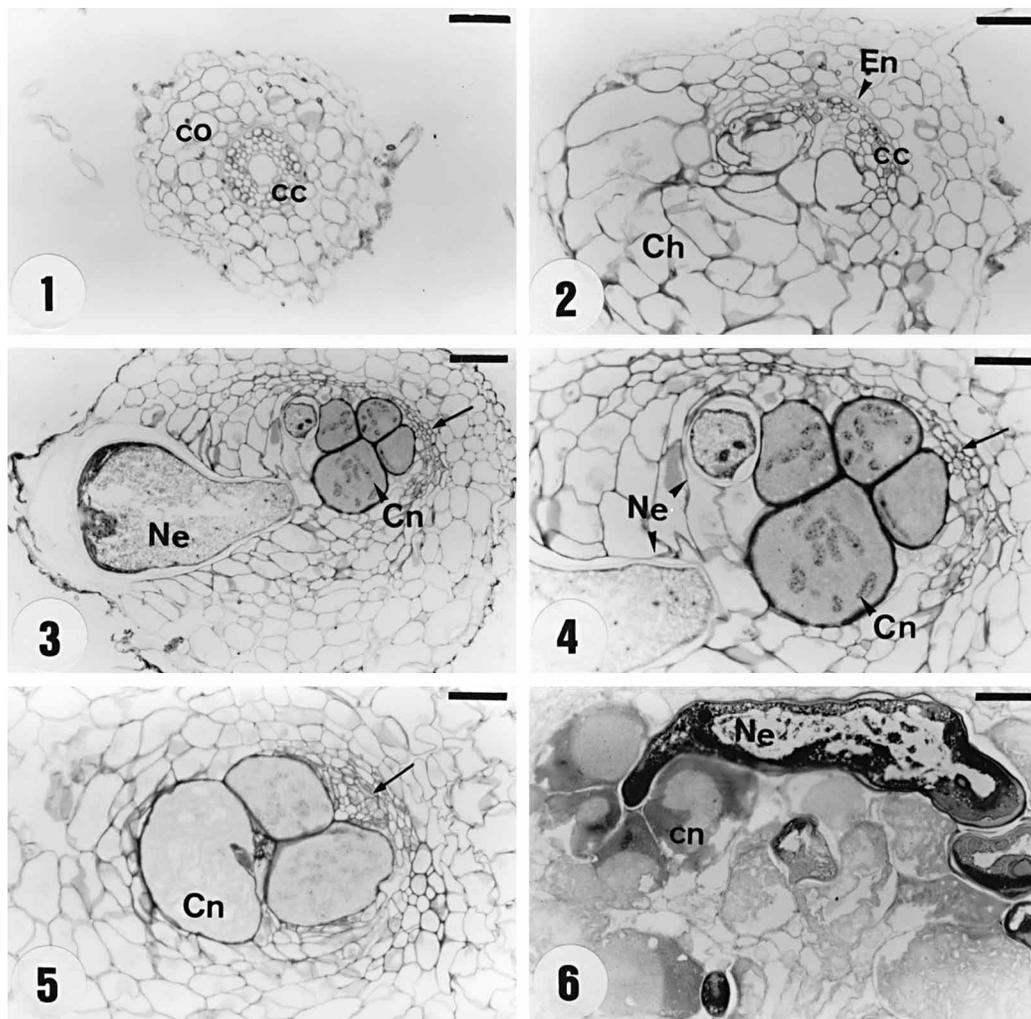
Aos 60 dias da inoculação, as raízes das plantas foram removidas do solo com auxílio de jatos de água, analisadas macroscopicamente quanto às alterações morfológicas e, por fim, processadas para o exame anatômico detalhado. Fragmentos de raízes, de 1 a 3 cm de comprimento, mostrando galhas típicas ou apenas leves engrossamentos, foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratados em série alcoólica-etílica, infiltrados com a resina glicol metacrilato e seccionados transversal ou longitudinalmente a 5 µm de espessura em micrótomo rotatório.

Para a análise anatômica, as seções obtidas foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato (Sakai, 1975). Para evidenciar as proteínas totais foi empregado o corante "Aniline blue black" (Fisher, 1968) e, na análise de polissacarídeos, utilizou-se o corante vermelho de rutênio (Johansen, 1940). A montagem das lâminas foi feita em resina sintética e as fotomicrografias tomadas ao fotomicroscópio NIKON AFX-DX. O mesmo procedimento geral foi adotado em relação às raízes das plantas não inoculadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora o cultivar utilizado seja considerado favorável ao desenvolvimento e à reprodução do nematóide, o exame macroscópico das raízes das plantas inoculadas revelou ocorrência esporádica de galhas, sintoma típico da maioria dos casos de parasitismo por espécies de *Meloidogyne*. As principais alterações morfológicas consistiram no tênue engrossamento de porções limitadas das raízes, em especial das laterais (radicelas), e a eventual presença de pequenas galhas (1 a 2 mm de diâmetro), principalmente junto à extremidade das raízes.

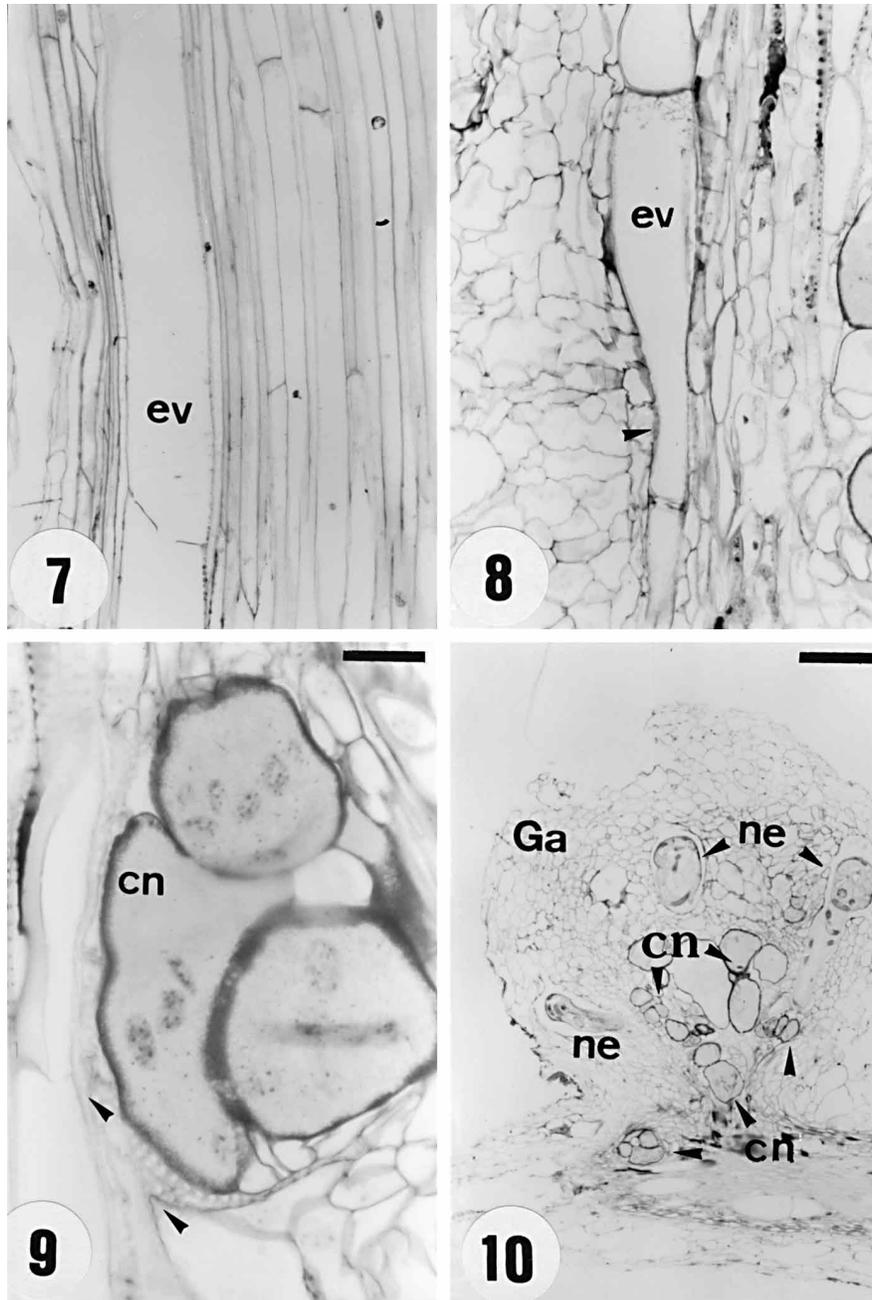
Nas partes das raízes em que externamente foram verificados engrossamentos, observaram-se alterações anatômicas típicas do parasitismo de *Meloidogyne*. As células do parênquima cortical apresentaram intensa hipertrofia (Fig. 2), condição não observada nas raízes não inoculadas (Fig. 1). No entanto, a alteração mais marcante na anatomia interna da raiz consistiu no estabelecimento de sítios de alimentação, constituídos por células gigantes, com paredes mais espessas que as normais e citoplasma denso e por vezes granuloso, multinucleadas, formadas a partir de células do parênquima vascular (Figs. 3, 4 e 5). A presença das células gigantes na região estelar e a hipertrofia do parênquima cortical provocaram visível compressão e mesmo a obliteração de elementos de vaso do xilema (comparar a Fig. 7 com as Figs. 8 e 9), resultando em completa desorganização do cilindro central (Figs. 3 a 5). A obliteração de elementos de vasos do xilema (Figs. 8 e 9), não verificada nas raízes não inoculadas (Fig. 7), pode exercer importante interferência nos fluxos de



Figs. 1-6. 1) Raiz sadia de milho do híbrido BR 106 (barra = 205 μ m). 2 a 6) Raízes parasitadas por *Meloidogyne javanica* aos 60 dias após a inoculação. 2) Detalhe da hipertrofia das células do parênquima cortical (barra = 205 μ m). 3) Corte transversal de raiz parasitada mostrando uma fêmea de *M. javanica* (Ne) e um conjunto de células gigantes, multinucleadas. A seta indica o cilindro central obliterado (barra = 205 μ m). 4 e 5) Detalhes das células gigantes. As setas indicam o cilindro central obliterado (barra = 102 μ m). 6) Corte transversal corado com 'Aniline blue black' mostrando o alto teor protéico das células gigantes (barra = 102 μ m); co = córtex; cc = cilindro central; Ch = células hipertrofiadas; En = endoderme; Ne = nematóide; Cn = células gigantes.

água e de nutrientes na planta, mas a magnitude dessa disfunção permanece ainda não totalmente elucidada (Hussey, 1985). As presentes observações mostraram-se concordantes, no geral, com aquelas procedidas anteriormente para *M. incognita*

(Baldwin e Barker, 1970 a) e *M. hapla* (Ogbuji, 1976) nos Estados Unidos. No presente trabalho, bem como no estudo desenvolvido com *M. hapla*, observou-se a presença de muitos elementos de vaso do xilema anormais, de tamanho reduzido e



Figs. 7-10. 7) Corte longitudinal de raiz sadia do milho híbrido BR 106, evidenciando os elementos de vaso do xilema (barra = 102 μ m). 8-9) Corte longitudinal de raízes do milho híbrido BR 106 parasitadas por *M. javanica*. 8) A seta indica a obliteração do elemento de vaso do xilema (seta superior) e presença de elementos de vaso do xilema anormais (seta inferior) devidos à compressão exercida pelas células gigantes (barra = 53 μ m). 9) Detalhe da obliteração de elementos de vaso do xilema (seta superior) e presença de elementos de vaso do xilema anormais (seta inferior) devidos à compressão exercida pelas células gigantes (barra = 53 μ m). 10) Visão geral de uma galha (barra = 552 μ m). ev = elemento de vaso do xilema; ne = nematóide; cn = célula gigante; Ga = galha.

providos de espessa parede, ao redor das células gigantes (Fig. 9, indicado pela seta inferior), que aparentemente representariam esforço do hospedeiro no sentido de conter o desenvolvimento das células gigantes (Siddiqui e Taylor, 1970). Entretanto, no caso de *M. hapla*, relatou-se ainda a ocorrência de células gigantes diferenciadas localizadas no parênquima cortical (“cortical giant cells”), caracterizadas por parede bem mais fina que a das células gigantes formadas no cilindro vascular e típica aglomeração dos núcleos na parte central do citoplasma, o que não foi ora verificado nas raízes parasitadas por *M. javanica*.

As células gigantes encontradas nas raízes de milho (Figs. 3 a 6 e 9), assemelham-se muito àquelas descritas em raízes de soja como do “tipo 4” (Dropkin e Nelson, 1960), ou seja: grandes, com as paredes espessas, multinucleadas, providas de citoplasma denso com poucas inclusões, e normalmente associadas a rápido desenvolvimento do parasito e abundante produção de ovos.

O corante “Aniline blue black” indicou alto teor protéico nas células gigantes quando comparadas com as demais células parenquimáticas (Fig. 6), evidenciando a função de dreno de nutrientes exercida por essas células na alimentação do nematóide, fato já relatado para outras espécies vegetais (Huang, 1985). A reação da espessa parede das células gigantes (Figs. 4 e 9) ao corante vermelho de rutênio evidenciou impregnação com substâncias pécnicas. Em soja, foi verificado (Dropkin e Nelson, 1960) que a parede das células gigantes continha celulose e pectina, mas não lignina ou suberina, não tendo, porém, essa característica sido claramente relacionada com o processo de parasitismo.

Embora esporádicas e pouco evidentes a olho nu, galhas típicas foram formadas próximas às extremidades das raízes (Fig. 10). Nelas, pode-se encontrar muitos nematóides em diferentes estádios de des-

envolvimento, associados aos grupos de células gigantes, causando completa desorganização dos tecidos.

O fato de muitos cultivares de milho, ditos tolerantes, não exibirem sintomas visíveis de parasitismo na parte aérea sob condição de campo, mesmo sendo hospedeiros favoráveis a *M. javanica*, pode estar relacionado com a localização mais terminal das galhas nas raízes, de modo que os fluxos de água e de nutrientes não sejam grandemente alterados, e, adicionalmente, ao volumoso sistema radicular característico dessa poácea, que favoreceria uma compensação aos eventuais danos causados. De outra parte, a presença de muitas fêmeas maduras no interior das raízes, intimamente associadas às células gigantes bem desenvolvidas, ora documentada (Fig. 6), vem justificar a alta taxa reprodutiva de *M. javanica* determinada em vários desses cultivares, prestando-se bem tal fato a ilustrar a importância de criteriosa seleção dos híbridos/variedades comerciais de milho a serem incluídos em programas de rotação visando redução dos níveis populacionais de *M. javanica* ou de outras espécies de nematóides de galhas em áreas infestadas.

AGRADECIMENTOS

À Sra. Marli K. Soares, pela assistência nas técnicas histológicas.

LITERATURA CITADA

- ASMUS, G. L. e P. J. M. ANDRADE. 1997. Reprodução de *Meloidogyne javanica* em cultivares de milho. *Nematologia Brasileira* 21:39-47.
- BALDWIN, J. G., and K. R. BARKER. 1970a. Histopathology of corn hybrids infected with root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 60:1195-1198.
- BALDWIN, J. G., and K. R. BARKER. 1970b. Host suitability of selected hybrids, varieties and inbreds of corn to populations of *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology* 2:345-350.
- BRITO, J. A. e H. ANTONIO. 1989. Resistência de genótipos de milho a *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 13:129-137.

- DROPKIN, V. H. 1959. Varietal response of soybeans to *Meloidogyne* - a bioassay system for separating races of root-knot nematodes. *Phytopathology* 49:18-23.
- DROPKIN, V. H., and P. E. NELSON. 1960. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology* 50:442-447.
- FISHER, D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16: 92-96.
- GUIMARÃES FILHO, O. 1993. Reação de genótipos de milho (*Zea mays* L.) a *Meloidogyne javanica*. Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 54p. Tese de Mestrado.
- HUANG, C. S. 1985. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. Pp. 155-164 in J. N. Sasser, and C. C. Carter, eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.
- HUSSEY, R. S. 1985. Host-parasite relationships and associated physiological changes. Pp. 143-153 in J. N. Sasser, and C. C. Carter, eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York, NY, U.S.A.
- JOHNSON, A. W. 1975. Resistance of sweet corn cultivars to plant-parasitic nematodes. *Plant Disease Reporter* 59:373-376.
- JOHNSON, A. W. 1985. Specific crop rotation effects combined with cultural practices and nematocides. Pp. 283-301 in J. N. Sasser, and C. C. Carter, eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.
- KARNOVSKY, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- LORDELLO, A. I. L., R. R. A. LORDELLO e E. SAWAZAKI. 1989. Resistência de milho a *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 13:71-79.
- NELSON, R. R. 1957. Resistance in corn to *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 47:26-27.
- OGBUJI, R. O. 1976. Giant cell formation in corn roots caused by *Meloidogyne hapla* infection. *Nematologica* 22:62-64.
- RAYMUNDO, S. A. 1985. Cropping systems research and root-knot nematode control. Pp. 277-281 in J. N. Sasser and C. C. Carter, eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.
- SAKAI, W. S. 1975. Simple method for differential staining of parafilm embedded plant material using toluidine blue O1. *Stain Technology* 48:247-249.
- SIDDQUI, I. A. and D. P. TAYLOR. 1970. Histopathogenesis of galls induced by *Meloidogyne naasi*. *Journal of Nematology* 2:239-247.
- TAYLOR, A. L., and J. N. SASSER. 1978. *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.
- WINDHAM, G. L., and W. P. WILLIAMS. 1988. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on corn hybrids and inbreds. *Annals of Applied Nematology* 2:25-28.

Received:

22.IX.1999

Accepted for publication:

27.XII.1999

Recibido:

Aceptado para publicación:

BLANK PAGE USED IN PAGE COUNT