



**JEANNY ALICE VELLOSO**

**INFLUENCE OF PLANT VOLATILES ON THE  
*Heterodera glycines* HATCHING AND EFFECTS OF  
TEMPERATURE ON THE DURATION OF THE LIFE  
CYCLE OF *Meloidogyne enterolobii* AND *Meloidogyne  
floridensis***

**LAVRAS – MG  
2020**

**JEANNY ALICE VELLOSO**

**INFLUENCE OF PLANT VOLATILES ON THE *Heterodera glycines*  
HATCHING AND EFFECTS OF TEMPERATURE ON THE DURATION OF  
THE LIFE CYCLE OF *Meloidogyne enterolobii* AND *Meloidogyne floridensis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Velloso, Jeanny Alice.

Influence of plant volatiles on the *Heterodera glycines* hatching and effects of temperature on the duration of the life cycle of *Meloidogyne enterolobii* and *Meloidogyne floridensis* / Jeanny Alice Velloso. - 2020.

60 p. : il.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.  
Bibliografia.

1. COVs. 2. *Heterodera glycines*. 3. *Meloidogyne* spp. I.  
Campos, Vicente Paulo. II. Título.

**JEANNY ALICE VELLOSO**

**INFLUENCE OF PLANT VOLATILES ON THE *Heterodera glycines*  
HATCHING AND EFFECTS OF TEMPERATURE ON THE DURATION OF  
THE LIFE CYCLE OF *Meloidogyne enterolobii* AND *Meloidogyne floridensis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de agosto de 2020.

Dr. Eduardo Souza Freire UniRV  
Dr. Fillippe Elias de Freitas Soares UFLA  
Dr. Willian César Terra UFLA

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2020**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me conceder forças e sabedoria nos momentos difíceis, alegria nos momentos de superação e fé para prosseguir na caminhada durante todos esses anos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia (DFP) pelos conhecimentos compartilhados e ao professor Marcio Pedroso pela disponibilidade e colaboração.

Ao professor Vicente Paulo Campos, pela orientação, pelos conselhos e por todos os ensinamentos compartilhados durante esses anos de convivência no laboratório.

Ao professor Donald Dickson da Universidade da Flórida, pela oportunidade e auxílio financeiro, os quais tornaram possível a realização das pesquisas em seu laboratório, e à Dra. Janete Brito e Dra. Mary Ann pela amizade e contribuição para com os experimentos.

Aos estagiários e colegas do laboratório pela convivência, colaboração e pelos momentos de descontração, representados aqui pela Luma e Tarlei, também pela grande ajuda nos momentos que precisei.

Aos colegas, Aline, Julio e Willian, por compartilharem seus conhecimentos e experiências, colaborando para a realização dos experimentos e escrita dos trabalhos.

Às minhas amigas Érica, Beatriz e Marina pela amizade, apoio emocional e troca de ideias, os quais foram essenciais durante essa caminhada.

À minha família, mãe, pai, irmã, avó (in memoriam) e tios, pela dedicação, amor, paciência e orações para que eu pudesse superar os desafios em busca de mais esta conquista.

**OBRIGADA!**

## RESUMO

Os fitonematoides são importantes patógenos de solo por causarem danos nas plantas e nos produtos agrícolas. Novas estratégias de manejo que busquem reduzir os danos causados por eles são necessárias. A identificação de moléculas químicas capazes de estimular eclosão dos juvenis de segundo estágio (J2) ou de matá-los pode contribuir com este propósito. No presente estudo, o efeito de compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por diferentes espécies vegetais foi investigado na eclosão de J2 de *Heterodera glycines* em experimentos *in vitro*. Os COVs de todas as plantas testadas aumentaram a eclosão dos J2 de *H. glycines*. Os COVs emitidos por folhas e raízes de soja e de feijão aumentaram a eclosão dos J2 em até 71,4%. Quatro compostos identificados nas emissões vegetais por cromatografia gasosa foram testados individualmente como indutores ou inibidores de eclosão, sendo eles 3-octanol, 1-hexanol, hexanal e linalol. Nas concentrações de 200, 600 e 1000 µg/mL, estes compostos não induziram a eclosão dos J2 de *H. glycines*. Em contrapartida, nas três concentrações, os compostos 3-octanol e 1-hexanol reduziram a eclosão e, em testes posteriores, apresentaram valores de concentração letal média (CL<sub>50</sub>) ao J2 de *H. glycines* de 177 e 219 µg/mL, respectivamente. Portanto, moléculas em mistura nas emissões das plantas induzem a eclosão, mas algumas delas, isoladamente, causam toxidez ao nematoide sem induzir a eclosão. Na segunda parte desta tese foi estudado o efeito da temperatura na duração do ciclo de vida de *Meloidogyne enterolobii*, *M. floridensis* e *M. incognita*. Para as três espécies, 5 dias após a inoculação (DAI), maior porcentagem de penetração de J2 em raízes de tomateiro foi observada à 30°C do que à 25°C e 30-25°C. No entanto, não houve diferença entre as espécies dentro da mesma temperatura. Todas as espécies tiveram geração mais curta à 30°C. O tempo de desenvolvimento do J2 infectivo para o estágio reprodutivo (fêmeas adultas) foi mais curto à 30°C comparados à 25°C e 30-25°C, com produção de ovos observada aos 17 DAI para todas as três espécies. Durante o período de avaliação (29 dias), uma geração de J2 à J2 foi completa à 30°C para todas as espécies, enquanto à 30-25°C apenas *M. floridensis* foi capaz de fechar o ciclo e, à 25°C, nenhuma delas. Na temperatura de 30°C, *M. enterolobii* completou o ciclo de vida (de J2 a J2) aos 23 DAI (506.9 DD) e *M. floridensis* e *M. incognita* aos 25 dias (552.3 DD). Para *M. floridensis* e *M. incognita*, mantidos à 30°C, foram observados J2 da segunda geração penetrando as raízes de tomateiro 12 dias (266.6 DD) após a primeira observação da formação de massa de ovos, enquanto para *M. enterolobii*, eles foram observados após 10 dias (221.2 DD). Na temperatura de 30-25°C, a penetração da segunda geração de J2 foi observada apenas para *M. floridensis* e ocorreu 12 dias após a observação da massa de ovos (196.1 DD). A exposição à temperatura de 25°C diminuiu o parasitismo e atrasou o ciclo de vida de *M. enterolobii* and *M. floridensis* em plantas de tomate.

**Palavras-chave:** Ciclo de vida, Desenvolvimento, Eclosão, *Heterodera glycines*, *Meloidogyne* spp., Temperatura, Voláteis.

## ABSTRACT

Plant-parasitic nematodes are important soil born pathogen causing losses in quantity and quality of the agricultural products. New management strategies are necessary to reduce the damage caused by these parasites. The identification of chemical molecules capable of stimulating the second-stage juveniles (J2) hatching or killing them can contribute to this purpose. In the present study we evaluated the effect of volatile organic compounds (VOCs) emitted by different plant species on the *Heterodera glycines* J2 hatching in *in vitro* experiments. VOCs of all tested plant species increased *H. glycines* J2 hatching. VOCs emitted by soybean and bean leaves and roots increased the hatching of the J2 up to 71.4%. Four compounds identified in plant emissions by gas chromatography analysis were individually tested as inductors or inhibitors hatching which were 3-octanol, 1-hexanol, hexanal and linalool. Under concentrations of 200, 600 e 1000 µg/mL, there was no hatching induction of *H. glycines* J2 by these compounds. On the other hand, in the three concentrations tested, the compounds 3-octanol and 1-hexanol reduced the hatching and, in subsequent tests, they showed mean lethal concentration values (LC<sub>50</sub>) to *H. glycines* J2 of 177 and 219 µg/mL, respectively. Therefore, molecules mixed in plant emissions induce hatching, but some of them alone cause toxicity to the nematode without causing hatching induction. In the second part of this thesis, the effects of temperature on the life cycle of *Meloidogyne enterolobii*, *M. floridensis* and *M. incognita* was studied. Invasion of the roots by the three species at 5 days after inoculation (DAI) was higher at 30°C than at 25°C and 30-25°C. However, there was no difference in the percentage of penetrated J2 among species in each temperature regime. All three RKN species had shorter generation time at 30°C. Developmental time from infective J2 to reproductive stage was shorter at 30°C than at 25°C and 30-25°C with egg mass production observed at 17 DAI for all three species. During the timeframe of 29 days at 30°C, for all three species, a single generation from J2 to J2 was completed while at 30-25°C it occurred only for *M. floridensis*, and at 25°C no species managed to complete the life cycle. At 30°C, *M. enterolobii* completed the life cycle (from J2 to J2) at 23 DAI (506.9 DD) and *M. floridensis* and *M. incognita* at 25 days (552.3 DD). At 30°C, second-generation juveniles penetrated the roots after 12 days (266.6 DD) from the first observation of egg mass formation for *M. floridensis* and *M. incognita* and after 10 days (221.2 DD) for *M. enterolobii*. At 30-25°C, it occurred after 12 days (196.1 DD) only for *M. floridensis*. Exposure to the temperature of 25°C decreased root invasion and delayed the life cycle completion of *M. enterolobii* and *M. floridensis* on tomato plants.

**Keywords:** Development, Hatching, *Heterodera glycines*, Life cycle, *Meloidogyne* spp., Temperature, Volatiles.

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                       |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|          | <b>PRIMEIRA PARTE .....</b>                                                                                                                           | <b>9</b>  |
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>                                                                                                                         | <b>9</b>  |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                              | <b>12</b> |
|          | <b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS .....</b>                                                                                                                  | <b>14</b> |
|          | <b>ARTIGO 1 - Estratégias diferentes de voláteis emitidos por diferentes espécies vegetais na eclosão de <i>Heterodera glycines</i> .....</b>         | <b>14</b> |
|          | <b>ARTIGO 2 - Effects of temperature on the duration of the life cycle of <i>Meloidogyne enterolobii</i> and <i>Meloidogyne floridensis</i> .....</b> | <b>37</b> |



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides estão entre os animais mais abundantes na terra e estão presentes em todos os níveis tróficos da cadeia alimentar do solo, sendo classificados com base nas suas associações alimentares em bacterívoros, fungívoros, parasitas de plantas (fitonematoides), onívoros e predadores (HOOGEN et al., 2019). Dentre estes, os fitonematoides são importantes patógenos de solo para a agricultura por causarem danos nas plantas e na qualidade dos produtos (WESEMAEL et al., 2011), gerando perdas na produção agrícola estimadas em 15% nas regiões tropicais e sub-tropicais (NICOL et al., 2011) e em US\$157 bilhões anualmente no mundo (ABAD et al., 2008).

Os nematoides das galhas, *Meloidogyne* Göldi, constitui o grupo dos mais importantes fitonematoides por serem polífagos, altamente adaptados (KARSSSEN et al., 2013) e, embora o impacto causado por eles seja maior nas regiões tropicais, este grupo se encontra disseminado mundialmente sendo, portanto, de importância econômica global (JONES et al., 2013). *Meloidogyne* spp. são endoparasitas sedentários e tipicamente induzem a multiplicação celular e conseqüente formação de galhas nas raízes do hospedeiro as quais constituem seus locais de alimentação para obtenção de nutrientes (JONES et al., 2013), dificultando a absorção de água e nutrientes pelas radículas infectadas (KARSSSEN et al., 2013).

O segundo grupo dos fitonematoides mais importante são os nematoides de cisto, a exemplo do gênero *Heterodera* Ichinohe. A espécie *H. glycines*, o nematoide do cisto da soja (NCS), é um endoparasita sedentário do sistema radicular com alta capacidade de adaptação às diferentes condições climáticas das diversas regiões produtoras de soja. (NIBLACK et al., 2006). Após a morte, os corpos das fêmeas dos nematoides deste grupo se tornam enrijecidos e de coloração marrom, denominados cistos, os quais mantêm ovos viáveis retidos em seu interior. Os cistos podem permanecer viáveis no solo por anos e este mecanismo de sobrevivência faz de *H. glycines* um dos principais e mais danosos patógenos em soja em todo o mundo (TURNER; SUBBOTIN, 2013). Outra característica peculiar dos nematoides de cistos e, portanto, de *H. glycines*, é regulação da eclosão por meio da presença dos exudatos radiculares do hospedeiro, garantindo também sua sobrevivência na ausência deste (TURNER; SUBBOTIN, 2013; THAPA et al., 2017).

O controle destes fitonematoides é um desafio na produção de alimentos e o uso de nematicidas químicos ainda tem sido realizado como principal estratégia (TERRA et al., 2018). Apesar disso, ainda existem poucos produtos disponíveis e é comum a retirada de

produtos do mercado devido à sua alta toxicidade ao homem e ao ambiente (MCCARTER, 2008; HAYDOCK et al., 2013). Neste sentido, a medida mais eficaz, segura e econômica é o plantio de cultivares resistentes. No entanto, o plantio constante apenas destas cultivares pode levar à supressão da resistência das plantas pelos fitonematoides, tornando-as ineficaz e levando ao aumento de novas populações resistentes do patógeno (STARR et al., 2002; YAN; BAIDOO, 2018). Diante disso, ao pensar em controle de fitonematoides, deve-se ter em mente que dificilmente apenas um método de controle utilizado garantirá sua erradicação ou a redução da população abaixo do nível de dano e, por isso, diversas estratégias devem ser integradas no manejo destes patógenos, incluindo a rotação de culturas, o uso de plantas resistentes e de produtos biológicos ao tradicional manejo com nematicidas químicos (HAYDOCK et al., 2013).

A necessidade da descoberta de novas estratégias para a integração no manejo dos fitonematoides somada à crescente valorização da produção agrícola sustentável contribuíram para a intensificação das pesquisas em torno dos metabólitos das plantas. Metabólitos radiculares influenciam o comportamento, desenvolvimento, reprodução e até a sobrevivência dos nematoides (WANG et al., 2018). Exsudatos radiculares de diferentes espécies de plantas são relatados como atrativos ou repelentes à *M. incognita* e *H. glycines* (WANG et al., 2018) e induzem a eclosão de *H. glycines* (RIGGA et al., 2001).

Neste sentido, metabólitos como os compostos orgânicos voláteis (COVs) também podem influenciar o comportamento dos fitonematoides (CHENG et al., 2017; TORTO et al., 2018; ZHAI et al., 2018). Os COVs representam cerca de 1% dos metabólitos secundários das plantas (DUDAREVA et al., 2004). São compostos de até 20 átomos de carbono, com característica lipofílica e alta pressão de vapor, os quais podem ser liberados pelas membranas e serem lançados na atmosfera ou no solo (PICHERSKY et al., 2006). Os COVs são considerados potenciais para o desenvolvimento de nematicidas comerciais (CAMPOS et al., 2010) e sua ação antagonista tem sido estudada principalmente em J2 e ovos de *Meloidogyne* spp. (ECHEVERRIGARAY et al., 2010; AISSANI et al., 2015; BARROS et al., 2018; JARDIM et al., 2018; PEDROSO et al., 2019; SILVA et al., 2019). Observa-se, no entanto, que os efeitos dos COVs de plantas são largamente estudados com os nematoides das galhas, ressaltando-se a necessidade de estudos incluindo *H. glycines*, os quais até o momento, ainda não foram relatados. A investigação da interação dos COVs de plantas com estes fitonematoides podem contribuir para a busca de novas estratégias de controle.

Além das interações das plantas hospedeiras com os fitonematoides na rizosfera, diversos fatores também influenciam os fitonematoides. A temperatura é um dos o fatores mais determinates no desenvolvimento destes animais, devido à sua natureza poiquilotérmica, ou seja, a variação na temperatura do ambiente influencia sua adaptação ecológica (TRUDGILL et al., 2005), interferindo por exemplo, na penetração, estabelecimento do sítio de alimentação, desenvolvimento e ciclo de vida (TYLER, 1933). Estes processos são fundamentais para o estabelecimento das relações parasito-hospedeiro e, por isso, seu entendimento é também de grande importância na busca de estratégias contra os fitonematoides. Desta forma, este trabalho trata do estudo da influência do COVs de plantas na eclosão de *H. glycines* e também da avaliação dos efeitos da temperatura no desenvolvimento e ciclo de vida de *M. enterolobii* e *M. floridensis*.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, P. *et al.* Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, Aug. 2008.
- AISSANI, N. *et al.* Nematicidal activity of the volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n.27, p. 6120-6125. 2015.
- BARROS, A. F. *et al.* Nematicidal screening of essential oils and potent toxicity of *Dysphania ambrosioides* essential oil against *Meloidogyne incognita* in vitro and in vivo. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 7-8, p. 380-389, Apr. 2018.
- CHENG, W. *et al.* Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 16213, Nov. 2017.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, Aug. 2004.
- ECHEVERRIGARAY, S.; ZACARIA, J.; BELTRÃO, R. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 2, p. 199-203, Feb. 2010.
- HAYDOCK, P. P. J. *et al.* Chemical control of nematodes. *In*: PERRY, R. N.; MOENS, M. **Plant Nematodes**, 2. ed. Boston: CAB International, 2013. p. 459-479.
- JARDIM, I. N. *et al.* (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. **Journal of Pest Science**, Sussex, v. 91, n. 1, p. 479-487, Jan. 2018.
- JONES, J. T. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, Jul. 2013.
- KARSSSEN, G.; WESEMAEL, W.; MOENS, M. Root-knot nematodes. *In*: PERRY, R. N.; MOENS, M. **Plant Nematodes**, 2. ed. Boston: CAB International, 2013. p. 73-108.
- NIBLACK, T. L.; LAMBERT, K. N.; TYLKA, G. L. A Model Plant Pathogen from the Kingdom Animalia: *Heterodera glycines*, the Soybean Cyst Nematode. **Annual Review of Phytopathology**, United States, v. 44, p. 283-303, Apr. 2006.
- NICOL, J. M. *et al.* Current nematode threats to world agriculture. *In*: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Dordrecht: Springer, 2011. p. 21-43.
- PEDROSO, L. A. *et al.* Volatile organic compounds produced by castor bean cake incorporated into the soil exhibit toxic activity against *Meloidogyne incognita*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 75, n. 2, p. 476-483, Feb. 2019.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, Oxford, v. 311, n. 5762, p. 808-811, Feb. 2006.
- RIGA, E. *et al.* The impact of plant residues on the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, London, v. 23, n. 2, p. 168-173. 2001.

- SILVA, J. C. P. *et al.* Performance of volatiles emitted from different plant species against juveniles and eggs of *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, Guildford, v. 116, p. 196-203. 2019.
- STARR, J. L.; BRIDGE, J.; COOK, R. Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential. *In*: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International. 2002. p. 1-22.
- THAPA, S. *et al.* Embryogenesis in the parasitic nematode *Heterodera glycines* is independent of host derived hatching stimulation. **BioMed Central Developmental Biology**, California, v. 17, n. 2. 11 p., Jan. 2017.
- TORTO, B. *et al.* Management of cyst and root knot nematodes: a chemical ecology perspective. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 66, n. 33, p. 8672-8678, Jul. 2018.
- TURNER, S. J.; SUBBOTIN, S. A. Cyst nematodes. *In*: PERRY, R. N.; MOENS, M. **Plant Nematodes**, 2. ed. Boston: CAB International, 2013. p. 109-143.
- TRUDGILL, D. L. *et al.* Thermal time – concepts and utility. **Annals of Applied Biology**, v. 146, n. 1, p. 1-14, Feb. 2005.
- TYLER, J. Development of the root-knot nematode as affected by temperature. **Hilgardia**, California, v. 7, n. 10., p. 391-415, Apr. 1933.
- VAN DEN HOOGEN, J. *et al.* Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. **Nature**, v. 572, n. 7768, p. 194-198, Aug. 2019.
- WANG, C.; MASLER, E. P.; ROGERS, S. T. Response of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* infective juveniles to root tissues, root exudates, and root extracts from three plant species. **Plant Disease**, Washington, v. 102, n. 9, p. 1733-1740, Sep. 2018.
- WESEMAEL, W. M. L.; VIANNE, N.; MOENS, M. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. **Nematology**, College Park, v. 13, n. 1, p. 3-16, Jan. 2011.
- YAN, G.; BAIDOO, R. Current research status of *Heterodera glycines* resistance and its implication on soybean breeding. **Engineering**, China, v. 4, n. 4., p. 534-541, Jul. 2018.
- ZHAI, Y. *et al.* Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic soil against *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n.1, p. 253, Feb. 2018.

## SEGUNDA PARTE

### **ARTIGO 1 - Estratégias diferentes de voláteis emitidos por diferentes espécies vegetais na eclosão de *Heterodera glycines***

Jeanny A. Velloso<sup>1</sup>, Vicente P. Campos<sup>1</sup>, Willian C. Terra<sup>1</sup>, Aline F. Barros<sup>1</sup>, Márcio P. Pedroso<sup>2</sup>, Luma A. Pedroso<sup>1</sup>, Letícia L. Paula<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Nematology, Department of Plant Pathology, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brazil; <sup>2</sup>Department of Chemistry, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Elaborado de acordo com as normas do periódico Journal of Nematology (versão preliminar).

*Resumo:* Novas estratégias de manejo que busquem reduzir os danos causados pelo nematoide do cisto da soja, *Heterodera glycines*, são necessárias. A identificação de moléculas capazes de estimular eclosão dos juvenis de segundo estágio (J2) ou de matá-los pode contribuir com este propósito. No presente estudo, investigou-se o efeito dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por soja, feijão, azevém e alfafa sobre a eclosão dos J2 em experimentos *in vitro*. Os COVs de todas as plantas testadas aumentaram significativamente a eclosão de J2. As emissões das folhas e raízes de soja e de feijão aumentaram a eclosão em até 71,4%. A análise por cromatografia gasosa mostrou 44 compostos nas emissões vegetais e quatro deles foram testados individualmente como indutores ou inibidores de eclosão: 3-octanol, 1-hexanol, hexanal e linalol. Nas concentrações de 200, 600 e 1000 µg/ml nenhum composto induziu a eclosão de J2 no mesmo patamar que o controle positivo (ZnCl<sub>2</sub>). Em contrapartida, os compostos 3-octanol e 1-hexanol causaram redução na eclosão semelhante ao observado com o nematicida comercial (carbofurano, 415 µg/ml) nas três concentrações testadas. Em testes posteriores, os compostos 1-hexanol e 3-octanol apresentaram valores de concentração letal média (CL<sub>50</sub>) aos J2 de *H. glycines* de 210

e 228 µg/ml, respectivamente, no primeiro experimento e, 230 e 124 µg/ml no segundo. Portanto, moléculas em mistura nas emissões das plantas induzem a eclosão, mas algumas delas, isoladamente, causam toxidez ao nematoide.

*Palavras-chave:* Compostos orgânicos voláteis, ecologia, eclosão, *Glycine max*, *Heterodera glycines*, nematoide do cisto da soja.

A soja (*Glycine max* (L.) Merr) é uma fonte importante de alimentos, proteínas e óleo e, portanto, mais pesquisas são essenciais para aumentar seu rendimento sob diferentes condições, incluindo sobre estresse biótico (Pagano and Miransari, 2016). O nematoide do cisto da soja (NCS, *Heterodera glycines*) é um dos principais patógenos causadores de redução da produção em todo o mundo e, somente nos EUA, é o patógeno responsável por perdas de mais de U\$1 bilhão anualmente (Koening and Wrather, 2010; Wu et al., 2019). O plantio de cultivares resistentes ainda tem sido a estratégia de controle mais eficaz. Entretanto, o uso contínuo das mesmas fontes de resistência seleciona populações virulentas do nematoide (Yan and Baidoo, 2018). Dessa forma, novas estratégias de manejo que busquem reduzir os danos causados por este patógeno são necessárias.

*Heterodera glycines* é um endoparasita sedentário cujo ciclo de vida se inicia com a multiplicação celular e a embriogênese dentro do ovo, seguida por quatro estádios juvenis (J1 a J4) até o estágio adulto (fase reprodutiva). Dentro deste processo, ocorre a eclosão dos J2, fase na qual o nematoide precisa contar com suas reservas lipídicas que são limitadas para garantir sua sobrevivência até encontrar a planta hospedeira (Wharton, 2004). Os nematoides formadores de cisto, como *H. glycines*, desenvolveram uma sofisticada interação parasita-hospedeiro, na qual a eclosão do J2 é dependente da presença de exsudatos liberados por espécies vegetais hospedeiras, sincronizando então, a eclosão e a disponibilidade de alimento (Perry, 2002; Thapa et al., 2017).

Ao longo das últimas décadas, moléculas químicas com capacidade de estimular a eclosão dos J2 de *H. glycines* têm sido estudadas. Compostos químicos denominados de fatores de eclosão do NCS, as glicinoeclipinas A, B e C, foram isolados de extratos aquosos radiculares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Fukusawa et al., 1985; Masamune et al., 1987). O cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) também é um indutor da eclosão de *H. glycines* cuja ação ocorre devido a presença de enzimas dependentes de  $Zn^{2+}$  envolvidas na permeabilidade da casca do



ovo (Tefft and Bone, 1984; Perry et al., 2013). Estudos de Riga et al. (2001) demonstraram que exsudatos radiculares de soja e, curiosamente, de plantas não hospedeiras, incluindo azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e alfafa (*Medicago sativa* L.), estimulam a eclosão dos J2 de *H. glycines*. No entanto, os compostos químicos responsáveis por este comportamento ainda não foram determinados.

O conhecimento das respostas de *H. glycines* às moléculas liberadas pelo sistema radicular pode auxiliar na descoberta de novas formas de controle (Wang et al., 2018). Por exemplo, a identificação química de compostos indutores de eclosão liberados pelas plantas promovendo a eclosão de J2 sem a presença do hospedeiro (soja). Os estudos que buscaram identificar fatores de eclosão do NCS concentraram-se nos compostos de extratos ou exsudatos de raízes (Fukusawa et al., 1985; Masamune et al., 1987; Riga et al. 2001), sem investigar o papel dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por espécies vegetais na eclosão de J2 de *H. glycines*. Apesar de serem escassos os estudos sobre os efeitos dos COVs na eclosão, os efeitos tóxicos dos voláteis têm recebido mais atenção. Muitas espécies de plantas produzem COVs com atividade nematicida (Barros et al. 2014; Aissani et al. 2015; Silva et al. 2018; Silva et al., 2019; Gomes et al., 2020). Além disso, muitos deles apresentam potencial para serem utilizadas como biofumigantes do solo (Ntalli et al. 2018; Pedroso et al. 2019; Gomes et al., 2020).

Plantas de soja, feijão, azevém e alfafa possuem nos seus exsudatos e extratos radiculares estimuladores da eclosão do NCS (Riga et al., 2001) e, por isso, foram utilizadas na investigação da atuação de COVs na eclosão dos J2 de *H. glycines*. Desta forma, objetivou-se avaliar a influência de COVs destas plantas na eclosão, bem como caracterizá-los por cromatografia gasosa, e avaliar isoladamente os efeitos de alguns deles em ovos e J2 de *H. glycines*.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Obtenção do inóculo de Heterodera glycines: H. glycines* raça três foi multiplicada em plantas de soja suscetível, cultivar M6410 IPRO (Monsoy®), e mantidas em vasos de cerâmica em casa-de-vegetação. Cistos foram coletados das raízes e do solo de acordo com a técnica de Shepherd (1970) com modificações. Para a extração dos cistos, as raízes foram cuidadosamente separadas do solo. Em seguida, foram colocadas sobre peneira com abertura de 850 µm, acoplada a outra de 150 µm e, submetidas a um jato forte de água. Desta forma, os cistos ficaram retidos na peneira de 150 µm. Para extração de cistos presentes no solo, 200 cm<sup>3</sup> de solo foram colocados em um copo, onde adicionou-se, em seguida, água até completar um litro. Após um minuto sobre agitação no agitador de solo, a suspensão foi vertida em peneira de 850 µm acoplada à peneira de 150 µm. Os cistos e detritos orgânicos ficaram retidos na peneira de 150 µm. Para a obtenção dos ovos utilizou-se um conjunto de peneiras com abertura de 150, 75 e 25 µm. Os cistos foram depositados na peneira de 150 µm e pressionados mecanicamente com o auxílio de um recipiente com a base plana e lavados com jatos de água. Os ovos extraídos foram retidos na peneira de 25 µm, recolhidos em água com o auxílio de pisseta e colocados em câmara de eclosão com temperatura de 27 ± 2°C. Os juvenis de segundo estágio (J2) obtidos durante as primeiras 24 horas foram descartados e utilizados aqueles produzidos com 48 horas de incubação.

*Eclosão dos J2 de Heterodera glycines a partir de ovos expostos aos COVs emitidos por soja, feijão, azevém e alfafa:* Ovos de *H. glycines* foram expostos aos COVs emitidos por soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), azevém (*Lolium multiflorum*) e alfafa (*Medicago sativa*). Para isto, folhas e raízes de soja e feijão, folhas de alfafa e raízes de azevém foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1% por um minuto, seguido de três lavagens em água destilada. Após secagem do excesso de água em papel toalha, 1 g de cada material vegetal foi adicionado em um dos compartimentos de placas de

Petri de policarbonato bipartidas (Fernando et al., 2005) e, no outro compartimento, adicionaram-se 5 ml da suspensão aquosa contendo aproximadamente 1200 ovos de *H. glycines*. Como controle negativo, foram utilizadas placas bipartidas contendo apenas a suspensão de ovos na ausência de folhas ou raízes das plantas. As placas foram tampadas e seladas com plástico filme de PVC e incubadas à 25°C no escuro por cinco dias. A avaliação consistiu na quantificação do número de J2 eclodidos cinco dias após a instalação do experimento. Para isto, a suspensão aquosa contendo os J2 foi coletada e a contagem foi realizada utilizando câmara de Peters e microscópio de luz invertida.

*Caracterização dos COVs emitidos por soja, feijão, azevém alfafa:* Para a caracterização dos compostos voláteis foram preparadas seis replicatas dos tratamentos semelhantes ao descrito no item anterior. As amostras foram adicionadas em frascos de microextração de fase sólida (SPME) de 20 ml e mantidos fechados durante cinco dias em incubadora a 25°C. Para a extração dos COVs foi utilizada a técnica de SPME no modo headspace, usando a fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano). A temperatura e o tempo de extração foram 35°C e 30 minutos, respectivamente. Para a separação e identificação dos COVs foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GCMS-QP 2010 Ultra; Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases (AOC-5000; Shimadzu, Japan) e coluna HP-5 (5% fenil-95% dimetilsiloxano; 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). A temperatura do injetor, da interface e da fonte de íons do detector foi de 250°C, 240°C e 200°C, respectivamente. O injetor foi operado no modo splitless ou no modo split 1:2, de acordo com a intensidade dos picos nas amostras. Como gás de arraste foi utilizado He (grau 5.0) com vazão de 1,0 ml min<sup>-1</sup>. A programação da temperatura do forno do cromatógrafo a gás (GC) foi de 40°C até 130°C a 3°C min<sup>-1</sup> e então até 240°C a 10°C min<sup>-1</sup>. O espectrofotômetro de massa (MS) foi operado no modo de varredura na faixa de 40-350 u.m.a. Para a identificação

dos COVs nas amostras, os espectros de massas de cada pico do cromatograma foram extraídos por meio do programa Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS; v. 2.63). A identificação dos COVs foi realizada por comparação dos espectros de massas dos picos das amostras com espectros da biblioteca NIST pelo programa Mass Spectral Search Program (version 1.7, NIST, Washington - DC, USA) e por comparação dos índices de retenção obtidos experimentalmente (RI Exp.) com os índices de retenção da literatura (RI Lit.) (Adams, 2007; NIST, 2013; The Pherobase). Os índices de retenção experimentais foram obtidos por meio da injeção de uma série homóloga de alcanos. Para a comparação entre os espectros de massas serão considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80%.

*Eclosão dos J2 de Heterodera glycines após exposição dos ovos aos COVs identificados nas emissões gasosas de soja, feijão, azevém e alfafa:* Foi avaliado o efeito de quatro COVs identificados nas emissões gasosas de folhas e raízes das plantas sobre a eclosão de *H. glycines*. Estes compostos foram escolhidos de acordo com sua disponibilidade no mercado e custos para aquisição, sendo eles: 3-octanol (99%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1-hexanol (99.5%; Chem Service Inc, West Chester, PA, USA), hexanal (99.3%; Chem Service Inc, West Chester, PA, USA) e linalol (96%; TCI America, Portland, OR, USA). Cada um destes compostos foi utilizado no ensaio de eclosão de J2 a partir de ovos de *H. glycines*. Para isto, eles foram diluídos individualmente em solução aquosa de Tween 80 a 1% (0.01 g/ml). A seguir, uma alíquota de 0,5 ml da solução juntamente com uma suspensão aquosa de 0,5 ml contendo 300 ovos de *H. Glycines* foram colocadas em micro tubos de 1,5 ml. Os microtubos foram selados com plástico filme de PVC e incubados a 25°C por sete dias. As soluções dos compostos foram preparadas para atingir as concentrações finais de 200, 600 e 1000 µg/ml. Foram utilizados água, Tween 80 (1%) e Carbofurano (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-1-benzofuran-7-yl N-methyl carbamate; 415 µg/ml) como controle negativo e

ZnCl<sub>2</sub> (3mM) como controle positivo. Após sete dias, os tubos foram abertos e o número de J2 eclodidos foi quantificado. Os números obtidos foram utilizados para o cálculo de porcentagem de eclosão para cada tratamento.

*Atividade nematicida dos COVs contra J2 de Heterodera glycines:* Os COVs que causaram inibição da eclosão no ensaio anterior foram selecionados para a avaliação da sua toxicidade aos J2. Para tanto, determinou-se a concentração letal de média (CL<sub>50</sub>) dos compostos 1-hexanol e 3-octanol aos J2 de *H. glycines*. Para isto, os compostos foram preparados semelhantemente ao descrito no item anterior, porém, ajustou-se as concentrações finais para 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/ml. Em micro tubos de 2 ml, adicionou-se 0,5 ml da solução aquosa de cada composto juntamente com 0,5 ml da suspensão de J2. Os micro tubos foram selados com plástico filme de PVC e incubados a 25°C por 48 horas. Após este período, os micro tubos foram abertos e uma alíquota (100 µl) de cada replicata foi adicionada em orifícios de placas de poliestireno de 96 poços para determinação da mortalidade dos J2. A determinação dos nematoides mortos foi realizada adicionando-se 20 µl de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/l em cada orifício da placa. Os nematoides que permaneceram imóveis após 5 min foram considerados mortos. As porcentagens de mortalidade dos J2 obtidas em cada tratamento foram utilizadas para calcular CL<sub>50</sub> de cada um dos compostos, o que representa a concentração capaz de matar 50% da população de J2 de *H. glycines*.

*Análises estatísticas:* Os experimentos foram realizados duas vezes em delineamentos inteiramente casualizados com cinco repetições por tratamento nos ensaios de eclosão com as plantas e também naqueles com os compostos isoladamente, com seis repetições para o experimento de concentração letal. Análise combinada dos experimentos (Experimento 1 x Experimento 2) foi realizada e em todos os ensaios ela foi significativa ( $P < 0.05$ ), por isso, os resultados de cada experimento foram analisados separadamente. Previamente, os resultados

dos experimentos foram submetidos aos testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade da análise de variância (teste de Bartlett), de forma que transformações dos dados não foram necessárias. Assim, os dados de cada experimento foram submetidos ao teste F e quando significativos ( $P < 0.05$ ), foram submetidos ao teste de médias de Scott-Knott ( $P < 0.05$ ). As porcentagens de mortalidade foram submetidas a análise de regressão e a determinação da  $CL_{50}$  dos compostos foi realizada. Os programas Sisvar (versão 5.6) e SigmaPlot<sup>®</sup> (12.0) foram utilizados para as análises estatísticas e gráficos, respectivamente.

## RESULTADOS

*Eclosão dos J2 de Heterodera glycines a partir de ovos expostos aos COVs emitidos por soja, feijão, azevém e alfafa:* Nos dois experimentos, os COVs emitidos pelas diferentes espécies vegetais induziram aumento significativo ( $P = 0.0000$ ) na porcentagem de J2 de *H. glycines* eclodidos, quando comparados ao controle negativo (Tabela 1). No primeiro experimento, os COVs emitidos por folhas e raízes de soja e de feijão proporcionaram os maiores aumentos de eclosão, alcançando valores 71,4% maiores que o controle. No mesmo experimento, os voláteis de folhas de alfafa e raízes de azevém, também causaram aumentos significativos da eclosão dos J2. No segundo experimento, a maior porcentagem de eclosão foi observada a partir de ovos expostos aos voláteis das raízes de soja, sendo de 42,8% em relação ao controle. Os COVs emitidos pelas outras espécies vegetais também induziram aumento significativo do número de J2 eclodidos em relação ao controle.

Tabela 1. Eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines* após exposição dos ovos por cinco dias aos compostos orgânicos voláteis emitidos por folhas e raízes de soja e feijão, raízes de azevém e folhas de alfafa.

| Tratamento            | Eclosão (%)         |               |
|-----------------------|---------------------|---------------|
|                       | Experimento 1       | Experimento 2 |
| Controle <sup>x</sup> | 12.6 <sup>y</sup> c | 14.0 d        |
| Folhas de alfafa      | 17.8 b              | 17.5 b        |
| Raízes de azevém      | 18.8 b              | 15.7 c        |
| Raízes de feijão      | 19.8 a              | 18.1 b        |
| Folhas de feijão      | 20.6 a              | 16.4 c        |
| Raízes de soja        | 21.3 a              | 20.0 a        |
| Folhas de soja        | 21.6 a              | 18.6 b        |

<sup>x</sup> Controle: ovos apenas em água na ausência de folhas ou raízes nas placas.

<sup>y</sup>Médias representadas por letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knot ( $P < 0.05$ ).

*Caracterização dos COVs de soja, feijão, azevém e alfafa:* A análise de GC-MS dos COVs emitidos pelas raízes de soja, azevém e feijão revelou a presença de 22, 19 e 17 compostos, respectivamente. Nas emissões das folhas de soja, feijão e alfafa foram encontrados 14, 5 e 7 compostos, respectivamente (Tabela 2). No geral, a maioria dos compostos encontrados pertence às classes dos álcoois, ésteres e cetonas, mas com incidência de alguns compostos nas classes furanos, aldeídos, terpenos, pirazinas e outros. Os compostos 1-hexanol e 2-octanona foram detectados em todas as emissões de raízes analisadas (azevém, soja e feijão), mas não foram identificados nas amostras de folhas. Os compostos 2-octanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 6-metil-5-heptan-2-ol, 2-etil-1-hexanol, 2-octanona, 3-octanona, 6-octen-2-ona, pentan-3-ona e etenil-benzeno foram detectados apenas em raízes de soja e feijão. Nenhum composto foi identificado nas emissões de todas as plantas. Por outro lado, alguns compostos foram identificados exclusivamente em determinado material vegetal, como: heptil acetato, octil acetato, isopulegol acetato, n-nonil acetato, p-etilanol e 4-etil-1,2-dimetoxibenzeno em raízes de azevém; 3-octanol, lavandulol, 2-butanona, ionona e linalol em folhas de soja; hexanal, b-felandreno, 2-isopropil-3-metoxipirazina e 2-sec-butil-3-

metoxipirazina em raízes de soja; e, 1-octen-3-ol, etil 2-metilbutirato e etil butirato em folhas de alfafa. Três compostos não foram identificados, incluindo dois sesquiterpenos. Todos os compostos detectados apresentaram picos de baixa intensidade nas amostras e, por isso, foram categorizados apenas como picos menores (+).

Tabela 2. Compostos orgânicos voláteis de folhas ou raízes de soja, feijão, azevém e alfafa caracterizados por GC-MS.

| Composto              | RI exp. <sup>a</sup> | RI lit. <sup>b</sup> | Raízes de azevém | Folhas de soja | Raízes de soja | Folhas de feijão | Raízes de feijão | Folhas de alfafa |
|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>Álcoois</i>        |                      |                      |                  |                |                |                  |                  |                  |
| Etanol                |                      |                      | +                | +              | +              |                  |                  | +                |
| 3-Octanol             | 1001                 | 993                  |                  | +              |                |                  |                  |                  |
| 2-Octanol             | 1005                 | 997                  |                  |                | +              |                  | +                |                  |
| 3-Metil-1-butanol     | 737                  | 734                  | +                | +              | +              | +                | +                |                  |
| 2-Metil-1-butanol     | 745                  | 738                  | +                |                | +              | +                | +                |                  |
| 1-Hexanol             | 872                  | 867                  | +                |                | +              |                  | +                |                  |
| 1-Octen-3-ol          | 984                  | 978                  |                  |                |                |                  |                  | +                |
| 6-Metil-5-hepten-2-ol | 1000                 | 992                  |                  | +              | +              |                  | +                |                  |
| 2-Etil-1-hexanol      | 1032                 | 1029                 |                  |                | +              | +                | +                |                  |
| <i>Ésteres</i>        |                      |                      |                  |                |                |                  |                  |                  |
| Etil 2-metilbutirato  | 845                  | 848                  |                  |                |                |                  |                  | +                |
| Etil butirato         | 801                  | 802                  |                  |                |                |                  |                  | +                |
| Etil acetato          | 627                  | 623                  | +                |                |                |                  |                  | +                |
| Hexil acetato         | 1014                 | 1014                 | +                |                |                |                  | +                |                  |
| Decil acetato         | 1409                 | 1408                 | +                |                |                |                  |                  |                  |
| Heptil acetato        | 1113                 | 1113                 | +                |                |                |                  |                  |                  |
| Octil acetato         | 1211                 | 1211                 | +                |                |                |                  |                  |                  |
| n-Nonil acetato       | 1310                 | 1302                 | +                |                |                |                  |                  |                  |
| <i>Furanos</i>        |                      |                      |                  |                |                |                  |                  |                  |
| 2-Etilfurano          | 705                  | 708                  |                  | +              |                |                  | +                |                  |
| 2-Pentilfurano        | 990                  | 991                  | +                | +              |                |                  | +                |                  |
| <i>Cetonas</i>        |                      |                      |                  |                |                |                  |                  |                  |
| 2-Butanona            | 605                  | 605                  |                  | +              |                |                  |                  |                  |
| 2-Pentanona           | 703                  | 695                  |                  | +              | +              |                  |                  |                  |
| 2-Octanona            | 991                  | 990                  | +                |                | +              |                  | +                |                  |
| 3-Octanona            | 988                  | 986                  |                  | +              | +              |                  | +                | +                |
| 6-Octen-2-ona         | 985                  | 985                  |                  |                | +              |                  | +                |                  |
| 3-Pentanona           | 704                  | 700                  |                  | +              | +              |                  | +                |                  |
| 2-Nonanona            | 1092                 | 1091                 | +                |                | +              |                  |                  |                  |
| 3,5-Octadien-2-ona    | 1072                 | 1068                 |                  |                |                | +                | +                |                  |
| Ionona                | 1482                 | 1485                 |                  | +              |                |                  |                  |                  |



*Continuação Tabela*

| <i>Aldeídos</i>               |      |      |   |  |   |   |   |
|-------------------------------|------|------|---|--|---|---|---|
| Hexanal                       | 806  | 800  |   |  |   |   | + |
| <i>Terpenos</i>               |      |      |   |  |   |   |   |
| Linalol                       | 1103 | 1007 |   |  |   |   | + |
| M-Cimeno                      | 1024 | 1023 | + |  |   | + | + |
| B-felandreno                  | 1030 | 1025 |   |  |   | + |   |
| Lavandulol                    | 1167 | 1165 |   |  |   |   | + |
| Isopulegol acetato            | 1271 | 1273 | + |  |   |   |   |
| Sesquiterpeno*                | 1426 |      | + |  |   |   |   |
| Sesquiterpeno*                | 1432 |      |   |  |   |   | + |
| <i>Pirazinas</i>              |      |      |   |  |   |   |   |
| 3-Metoxi-2,5-dimetil pirazina | 1051 | 1057 |   |  |   |   | + |
| 2-Isopropil-3-metoxi pirazine | 1089 | 1093 |   |  |   |   | + |
| 2-Sec-butil-3-metoxi pirazine | 1167 | 1164 |   |  |   |   | + |
| <i>Outros</i>                 |      |      |   |  |   |   |   |
| P-Etilanisol                  | 1114 | 1104 | + |  |   |   |   |
| Etenil-benzeno                | 895  | 891  | + |  | + | + | + |
| 4-etil-1,2-dimetoxi benzeno   | 1322 |      | + |  |   |   |   |
| Não identificado              | 1019 |      |   |  |   |   | + |

<sup>a</sup>RI exp., índices de retenção calculado pela injeção de séries homólogas de alcanos.

<sup>b</sup>RI lit., índices de retenção de acordo com a literatura.

<sup>c</sup>Similaridade entre o espectro de massa do pico e o espectro de massa da biblioteca.

+, pico menor.

\* Não identificado. Espectro de massa similar aos sesquiterpenos.

*Eclosão dos J2 de Heterodera glycines após exposição dos ovos aos COVs identificados nas emissões gasosas de soja, feijão, azevém e alfafa:* Nos dois experimentos, nenhum dos compostos testados nas concentrações de 200, 600 e 1000 µg/ml, a saber 3-octanol, 1-hexanol, hexanal e linalol, induziu a eclosão de J2 no mesmo patamar que o controle positivo (ZnCl<sub>2</sub>) (Tabela 3). Ademais, o agente solubilizante utilizado para dissolver os compostos - Tween 80 a 1% - quando testado isoladamente foi mais eficaz em induzir a eclosão do que as soluções contendo os compostos. No segundo experimento, o agente

solubilizante Tween 80 a 1% apresentou porcentagem de eclosão similar ( $P = 0.0000$ ) ao controle positivo  $ZnCl_2$ .

Se por um lado nenhum dos compostos apresentou efeito indutor, os compostos 3-octanol e 1-hexanol causaram, nas três concentrações testadas, redução da eclosão semelhante ao observado com o carbofurano (415  $\mu\text{g/ml}$ ), o qual apresentou porcentagem de eclosão de no máximo 4.6%.

Tabela 3. Porcentagem de eclosão de J2 de *H. glycines* a partir de ovos expostos por 7 dias a diferentes concentrações de compostos voláteis identificados nas emissões gasosas de folhas ou raízes de soja, feijão e azevém.

| Tratamento       | Concentração<br>( $\mu\text{g/ml}$ ou $\text{mM}^x$ ) | Eclosão (%)         |               |
|------------------|-------------------------------------------------------|---------------------|---------------|
|                  |                                                       | Experimento 1       | Experimento 2 |
| Água             | -                                                     | 15.2 <sup>y</sup> d | 30.2 b        |
| Carbofurano      | 415                                                   | 3.0 f               | 4.6 c         |
| Cloreto de zinco | 3 <sup>x</sup>                                        | 31.4 a              | 44.4 a        |
| Tween 80         | -                                                     | 27.3 b              | 44.6 a        |
| Hexanal          | 1000                                                  | 25.3 c              | 31.0 b        |
|                  | 600                                                   | 23.8 c              | 28.0 b        |
|                  | 200                                                   | 22.7 c              | 30.1 b        |
| Linalol          | 1000                                                  | 13.3 d              | 26.0 b        |
|                  | 600                                                   | 15.3 d              | 25.0 b        |
|                  | 200                                                   | 16.8 d              | 28.4 b        |
| 1-Hexanol        | 1000                                                  | 2.9 f               | 5.3 c         |
|                  | 600                                                   | 1.9 f               | 4.1 c         |
|                  | 200                                                   | 3.4 f               | 5.5 c         |
| 3-Octanol        | 1000                                                  | 3.8 f               | 5.0 c         |
|                  | 600                                                   | 3.3 f               | 8.3 c         |
|                  | 200                                                   | 7.5 e               | 8.8 c         |

<sup>y</sup>Médias representadas por letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knot ( $P < 0.05$ ).

*Atividade nematicida dos COVs contra J2 de Heterodera glycines:* Através da análise de regressão, os valores da  $CL_{50}$  dos compostos 1-hexanol e 3-octanol foram de 210 e 228  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, no primeiro experimento e, 230 e 124  $\mu\text{g/ml}$  no segundo.

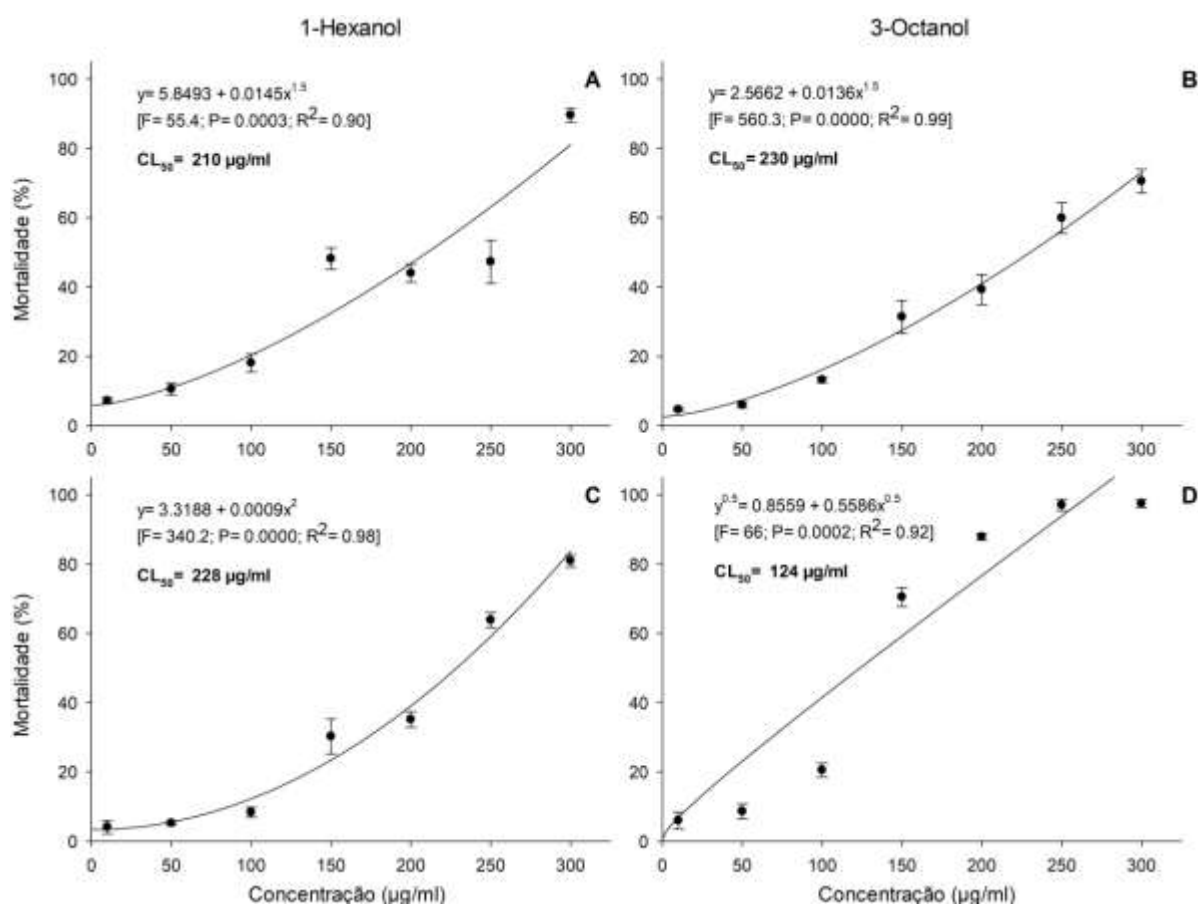


Fig. 1. Mortalidade e concentração letal média (CL<sub>50</sub>) a juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* expostos à diferentes concentrações de 1-hexanol e 3-octanol nos experimentos 1 (A e B) e 2 (C e D). Barras indicam o erro padrão da média.

## DISCUSSÃO

A indução da eclosão de J2 de *H. glycines* têm sido observada a partir de extratos e exsudatos de raízes incluindo soja, azevém e alfafa (Riga et al., 2001). Alguns compostos indutores já foram isolados de extratos radiculares de feijão, as glicinoeclipinas A, B e C (Fukusawa et al., 1985; Masamune et al., 1987). Estudos também com o NCS evidenciaram a ação indutora do cloreto de zinco (ZnCl<sub>2</sub>) (Tefft and Bone, 1984; Perry et al., 2013). Com o presente trabalho, ressalta-se o efeito de emissões voláteis de plantas como causa aditiva da indução a eclosão. A diversidade de moléculas voláteis identificadas por meio da GC-MS nas

emissões gasosas das plantas estudadas pode criar oportunidades para se encontrar isoladamente uma molécula que seja indutora eficaz da eclosão de J2 de *H. glycines*.

Após a eclosão, os J2 de fitonematoides têm reservas de energia limitadas para encontrar e infectar um hospedeiro (Rocha et al., 2010). Para maximizar a probabilidade de sucesso durante esse período sensível, os nematoides do cisto (*Heterodera* spp., *Globodera* spp.) desenvolveram comportamentos de eclosão mediados pelo hospedeiro (Thapa et al., 2017). Desta forma, uma vez conhecida a eficácia de uma ou mais moléculas voláteis na indução da eclosão de J2 do NCS, as pesquisas nesta linha e novas tecnologias podem levar a um produto comercial para a aplicação em pré plantio para estimular a eclosão em um período sem hospedeiro, o que levaria o nematoide a exaurir sua reserva energética corporal, e consequentemente à sua morte.

Neste trabalho, a identificação dos COVs emitidos pelas plantas por meio da GC-MS permitiu a investigação da interação individual de alguns deles com o nematoide. Quatro moléculas foram selecionadas para testes mais aprofundados de estímulo a eclosão: 3-octanol, 1-hexanol, hexanal e linalol. Estes compostos foram selecionados levando-se em conta estudos anteriores relatados na literatura, a disponibilidade para adquiri-los no comércio e custo. No entanto, nenhum deles induziu a eclosão do nematoide, ressaltando-se que este resultado ocorreu a partir das três concentrações e no período avaliados e, por isto, a possível atuação na indução não pode ser excluída. Além disso, o efeito sinérgico entre os compostos também não foi avaliado, o qual poderá ser esclarecido em pesquisas futuras. Estes resultados revelam também que, além do efeito dos COVs na indução da eclosão observado com as emissões das plantas, elas também produzem COVs tóxicos a *H. glycines*. Neste sentido, os compostos 3-octanol e 1-hexanol foram tóxicos ao nematoide causando inibição da eclosão, corroborando com relatos anteriores da toxicidade de voláteis emitidos por plantas

e microrganismos à fitonematoides (Freire et al., 2012; Aissani et al., 2015; Silva et al., 2018; Terra et al., 2018; Silva et al., 2019; Gomes et al., 2020).

Interessantemente, o Tween 80 (controle negativo) utilizado para dissolução dos COVs estimulou a eclosão em valor similar ao  $ZnCl_2$  (controle positivo). O  $ZnCl_2$  é um indutor da eclosão de *H. glycines* cuja ação ocorre devido a presença de enzimas dependentes de  $Zn^{2+}$  envolvidas na permeabilidade da casca do ovo (Tefft and Bone, 1984; Perry et al., 2013). A alteração da permeabilidade pode ser um ponto central na eclosão de nematoides de cistos (Perry and Trett, 1986). Em estudos com lepidópteros como *Galleria mellonella*, Tween 80 é utilizado como permeabilizante no processo de criopreservação dos ovos (Roversi et al., 2008; Cosi et al., 2010; Abidalla and Roversi, 2018). Dessa forma, o efeito do Tween 80, observado no presente trabalho, pode também estar relacionado à permeabilidade da casca do ovo de *H. glycines*, todavia, pesquisas complementares são necessários para o esclarecimento desta informação.

Nos últimos anos, estudos revelaram COVs emitidos por resíduos vegetais com atividade nematicida semelhantes aos nematicidas comerciais (Barros et al., 2014; Silva et al., 2018; Gomes et al., 2020). No presente estudo, diversos compostos identificados nas emissões vegetais, como 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-pentanona, 2-nonanona, linalol, m-cimeno, 2-octanol, 2-etil-1-hexanol, etil acetato, 2-etilfuran e 2-octanona têm comprovada atividade nematicida (Gu et al., 2007; Hewavitharana et al., 2014; Aissani et al., 2015; Sharma et al., 2018; Zhai et al., 2018). Neste sentido, os álcoois 3-octanol detectados em folhas de soja e 1-hexanol detectado em raízes de soja, feijão e azevém, foram tóxicos aos ovos e aos J2 de *H. glycines*. A atividade nematicida destes compostos já havia sido relatada para outros fitonematoides. Os vapores dos dois álcoois foram tóxicos aos ovos e J2 de *M. incognita* (Silva, 2015). A toxicidade de 3-octanol também foi relatada para *Drosophila melanogaster*, sendo letal na concentração de 14.7  $\mu$ l/ml (Inamdar et al., 2010). O óleo

essencial de *Origanum vulgare* (Lamiaceae), o qual possui atividade nematocida em *Bursaphelenchus xylophilus*, apresentou a presença de 3-octanol (1%), entretanto, o efeito isolado deste álcool não foi investigado pelos autores do estudo (Barbosa et al., 2010).

Portanto, plantas de soja, feijão, azevém e alfafa produzem nas folhas e raízes COVs indutores da eclosão de J2 de *H. glycines*. Algumas moléculas dessas emissões, isoladamente, não apresentaram indução da eclosão, mas causaram toxicidade em ovos e J2 do nematoide demonstrando outro modo de ação desses voláteis.

## REFERÊNCIAS

Abidalla, M., and Roversi, P. F. 2018. First estimation of *Drosophila* EPS solution for permeabilizing Lepidoptera *Galleria mellonella* embryos. *Advances in Entomology* 6: 213-225.

Adams, R. P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.

Aissani, N., Urgeghe, P. P., Oplos, C., Saba, M., Tocco, G., Petretto, G. L., Eloh, K., Menkissoglu-Spiroudi, U., Ntalli, N., and Caboni, P. 2015. Nematicidal activity of the volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:6120-6125.

Barbosa, P., Lima, A. S., Vieira, P., Dias, L. S., Tinoco, M. T., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C., and Mota, M. 2010. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology* 42:8-16.

Barros, A. F., Campos, V. P., Silva, J. C. P., Pedroso, M. P., Medeiros, F. H. V., Pozza, E. A., and Reale, A. L. 2014. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology* 80:34-43.

Cosi, E., Abidalla, M. T., and Roversi, P. F. 2010. The effect of Tween 80 on eggshell permeabilization in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Pyralidae). *CryoLetters* 31:291-300.

Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., and Savchuk, S. C. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry* 37:955-964.

Freire, E. S., Campos, V. P., Pinho, R. S. C., Oliveira, D. F., Faria, M. R., Pohlit, A. M., Norberto, N. P., Rezende, E. L., Pfenning, L. H., and Silva, J. R. C. 2012. Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. *Journal of Nematology* 44:321-328.

Fukusawa, A., Matsue, H., Ikura, M., and Masamune, T. 1985. Glycinoeclepins B and C, nortriterpenes related to glycinoeclepin A. *Tetrahedron Letters* 26:5539-5542.

Gomes, V. A., Campos, V. P., Silva, J. C. P., Silva, F. J., Silva, M. F., and Pedroso, M. P. 2020. Activity of papaya seeds (*Carica papaya*) against *Meloidogyne incognita* as a soil biofumigant. *Journal of Pest Science* 93:783-792.

Gu, Y. Q., Mo, M. H., Zhou, J. P., Zhou, C. S., and Zhang, K. Q. 2007. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* 39:2567-2575.

Hewavitharana, S. S., Ruddell, D., and Mazzola, M. 2014. Carbon source-dependent antifungal and nematicidal volatiles derived during anaerobic soil disinfestation. *European Journal of Plant Pathology* 140:39-52.

Inamdar, A. A., Masurekar, P., and Bennett, J. W. 2010. Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Toxicological Sciences* 117:418-426.



Koenning, S. R., and Wrather, J. A. 2010. Suppression of soybean yield potential in the continental United States from plant diseases estimated from 2006 to 2009. *Plant Health Prog.* <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-1122-01-RS>.

Masamune, T., Anetai, M., Fukuzawa, A., Takasugi, M., Matsue, H., Kobayashi, K., Ueno, S., and Katsui, N. 1987. Glycinoelipins, natural hatching stimuli for the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. I. Isolation. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 60:981-999.

NIST Chemistry Webook - National Institute of Standards and Technology. (Online) 2013. Available: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [22 September 2017].

Ntalli, N., Monokrousos, N., Rumbos, C., Kontea, D., Zioga, D., Argyropoulou, M. D., Menkissoglu-Spiroudi, U., and Tsiropoulos, N. G. 2018. Greenhouse biofumigation with *Melia azedarach* controls *Meloidogyne* spp. and enhances soil biological activity. *Journal of Pest Science* 91:29-40.

Pagano, M., and Miransari, M. 2016. The importance of soybean production worldwide. Pp. 1-26 in M. Miransari, ed. *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production*. San Diego: Academic Press.

Pedroso, L. A., Campos, V. P., Barros, A. F., Justino, J. C., and Paula, L. L. 2019. Activity against *Meloidogyne incognita* of volatile compounds produced during amendment of soil with castor bean cake. *Nematology* 0:1-10.

Perry, R. N., and Trett, M. W. 1986. Ultrastructure of the eggshell of *Heterodera schachtii* and *H. glycines* (Nematoda: Tylenchida). *Revue Nématol.* 9:399-403.

Perry, R. N. 2002. Hatching. Pp. 147-169 in D. L. Lee, ed. *The biology of nematodes*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.

Perry, R. N., Wright, D. J., and Chitwood, D. J. 2013. Reproduction, physiology and biochemistry. Pp. 219-245 in R. N. Perry and M. Moens, ed. *Plant Nematology*, ed. 2, Boston: CAB International.

Riga, E., Welacky, T., Potter, J., Anderson, T., Topp, E., and Tenuta, A. 2001. The impact of plant residues on the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23:168-173.

Rocha, F. S., Campos, V. P., and Souza, J. T. 2010. Variation in lipid reserves of second-stage juveniles of *Meloidogyne exigua* in a coffee field and its relationship with infectivity. *Nematology* 12:365-371.

Roversi, P. F., Cosi, E., and Irdani, T. 2008. Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Cryobiology* 56:1-7.

Sharma, I. P., Sharma, A. K., Prashad, L., Rana, V. S. 2018. Natural bacterial cell-free extracts with powerful nematocidal activity on root-knot nematode. *Rhizosphere* 5: 67-70.

Shepherd, A. M. 1970. Extraction and estimation of *Heterodera*. Pp. 23-33 in J. F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Technical Bulletin 2. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food; London: England.

Silva, J. C. P., Campos, V. P., Barros, A. F., Pedroso, M. P., Terra, W. C., Lopez, L. E., and Souza, J. T. 2018. Plant volatiles reduce the viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* either directly or when retained in water. *Plant Disease* 112:2170-2179.

Silva, M. F., Campos, V. P., Barros, A. F., Terra, W. C., Pedroso, M. P., Gomes, V. A., Ribeiro, C. R., and Siva, F. F. 2019. Volatile emissions of watercress (*Nasturtium*

*officinale*) leaves and passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds against *Meloidogyne incognita*. Past Management Science. DOI 10.1002/ps.5654.

Silva, A. P. 2015. Caracterização molecular de *Bursaphelenchus cocophilus* e controle de *Meloidogyne incognita* por moléculas orgânicas voláteis. Ph.D thesis, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Tefft, P. M., and Bone, L. W. 1984. Zinc-mediated hatching of eggs of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. Journal of Chemical Ecology 10(2): 361-372.

Terra, W. C., Campos, V. P., Martins, S. J., Costa, L. S. A. S., Silva, J. C. P., Barros, A. F., Lopez, L. E., Santos, T. C. N., Smant, G., and Oliveira, D. F. 2018. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 106: 125–131.

The Pherobase. (Online). Available: <http://www.pherobase.com/kovats/> [22 September 2017].

Thapa, S., Patel, J. A., Reuter-Carlson, U., and Schroeder, N. E. 2017. Embryogenesis in the parasitic nematode *Heterodera glycines* is independent of host derived hatching stimulation. BioMed Central Developmental Biology 17:2.

Wang, C., Masler, E. P., and Rogers, S. T. 2018. Response of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* infective juveniles to root tissues, root exudates, and root extracts from three plant species. Plant Disease 102:1733-1740.

Wharton, D. A. 2004. Survival strategies. Pp. 371-399 in R. Gaugler and A. L. Bilgrami, ed. Nematode behavior. Cambridge: CABI International.

Wu, H. Y., Luo, M., Zhang, L. Y., and Zhou, X. B. 2019. Nematicidal activity of fosthiazate against soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 51 e2019-21.

Yan, G., and Baidoo, R. 2018. Current research status of *Heterodera glycines* resistance and its implication on soybean breeding. *Engineering* 4:534-541.

Zhai, Y., Shao, Z., Cai, M., Zheng, L., Li, G., Huang, D., Cheng, W., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Yu, Z., and Zhang, J. 2018. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic soil against *Meloidogyne incognita*. *Frontiers Microbiology* 9:253 (2018).

**ARTIGO 2 - Effects of temperature on the duration of the life cycle of *Meloidogyne enterolobii* and *Meloidogyne floridensis***

Jeanny A. Velloso<sup>1</sup>, Mary Ann D. Maquilan<sup>2</sup>, Vicente P. Campos<sup>1</sup> and Donald W. Dickson<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Nematology, Department of Plant Pathology, Universidade Federal de Lavras (UFLA), P.O. Box 3037, 37200-900 Lavras, Minas Gerais, Brazil. <sup>2</sup>Entomology and Nematology Department, University of Florida, 1881 Natural Area Dr., Gainesville, Florida 32611, USA.

Elaborado de acordo com as normas do periódico Journal of Nematology (versão preliminar).

*Abstract:* *Meloidogyne enterolobii* and *M. floridensis* are virulent species that can overcome root-knot nematode resistance on economically important crop plants. Our objective was to study the effects of temperature on the invasion of second-stage juveniles (J2) and to determine differences on duration and thermal-time requirements (degree-days; DD) to complete developmental stages and life cycle of Florida populations of these two species compared to *M. incognita* race 3. Tomato plants were exposed to temperatures of 25 or 30°C and alternating temperatures of 30-25°C (day-night) in growth chambers. Invasion of the roots by the three species was higher at 30°C than at 25°C and 30-25°C, whose numbers were 33, 15, and 24%, respectively. However, there was no difference in the percentage of penetrated J2 among species in each temperature. Developmental time from infective J2 to reproductive stage for the three species was shorter at 30°C than at 25°C and 30-25°C. The shortest time and DD to egg production was 13 DAI for all three species and 285.7 DD. During the timeframe of 29 days, a single generation was completed at 30°C for all three species and at 30-25°C only for *M. floridensis*. The number of days and accumulated DD for completing the life cycle (from J2 to J2) were 23 days and 506.9 DD for *M. enterolobii*, and 25 days and 552.3 DD for *M. floridensis* and *M. incognita*. Exposure to lower (25°C) and

intermediate temperatures (30-25°C) decreased root invasion and delayed the life cycle completion of *M. enterolobii* and *M. floridensis*.

*Key words:* Degree-day, development, ecology, life cycle, *Meloidogyne enterolobii*, *M. floridensis*, root-knot nematode, temperature.

*Meloidogyne enterolobii* (syn. *M. mayaguensis*) is an emerging root-knot nematode (RKN), highly pathogenic and aggressive species (Castagnone-Sereno, 2012) which can infect a wide host range of many vegetables and field crops economically important (Yang and Eisenback, 1983; Carneiro et al., 2001; Brito et al., 2014). This nematode has been increasingly detected worldwide (Villar-Luna et al., 2016), and although its geographic distribution is still more limited than other common agriculturally important RKNs it is now referred to be also one of the most important (Subbotin, 2019). In addition to causing high infestation rate on the host roots with more severe root galling (Castagnone-Sereno, 2012), *M. enterolobii* is concerning also due to its ability to develop on resistant crops to the major root-knot nematodes (*M. arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*) including resistant sweet potato, soybean (Fargette and Braaksma, 1990), tomato (*Mi-1* gene), bell pepper (*N* gene) and sweet pepper (*Tabasco* gene) (Bruto et al., 2007; Kiewnick et al., 2009). Recently, it was also found infecting resistant sweet potato in South Carolina, USA (Rutter et al., 2019). *M. enterolobii* is also important in Brazil and has been reported to infect many economically important crops such as guava (Carneiro et al., 2001).

Another important RKN species is *M. floridensis* (Handoo et al., 2004), commonly known as ‘peach root-knot nematode’, and it is concerned in growing fields because it reproduces on ‘Nemaguard’, ‘Okinawa’, ‘Nemared’ and ‘Guardian’ (Sharpe et al., 1969; Sherman et al., 1991; Nyczepir et al., 1998) peach rootstocks resistant to *M. javanica* and *M. incognita* (Smith et al., 2015). *M. floridensis* was also reported infecting tomato (Church, 2007), cucumber, eggplant, snap bean and lilac tasselflower (Bruto et al., 2005). In the USA, there has been recent reports on the peach root-knot nematode *M. floridensis* reproducing on nematode-resistant peach rootstocks in California and South Carolina orchards (Reighard et al., 2019; Westphal et al., 2019). While the reported geographic distribution is limited to the

USA, other countries with similar climatic conditions and are lacking in nematode-resistant cultivars may be at risk if this nematode is introduced.

Temperature is an important factor affecting the nematode embryonic development, penetration, reproduction, and survival (Madulu and Trudgill, 1994; Trudgill and Perry, 1994; Thompson et al., 2015). Studies on thermal requirements of RKNs are important due to the poikilothermic nature of these pathogens, whereby temperature has a direct influence on their ecological adaptation (Trudgill et al., 2005). Thermal requirements of RKN species have been reported for *Meloidogyne incognita* (Triantaphyllou and Hirschmann, 1960), *M. hapla* (Trudgill and Perry, 1994), *M. javanica* and *M. arenaria*, (Madulu and Trudgill, 1994; Dávila-Negrón and Dickson, 2013), *M. hispanica* (Maleita et al., 2012) and *M. chitwoodi* and *M. fallax* (Khan et al., 2014). However, for both emergent species such as *M. enterolobii* and *M. floridensis*, the temperature required for their development and life cycle are still unknown. This knowledge may be useful to predict their development including egg mass formation as well as estimating the number of generations they may complete under different climate conditions (Yeon et al., 2003; Dávila et al., 2005), and also the regions where they are most likely to be successfully established. Therefore, the present study was carried out to study the effects of temperature on the life cycle and to determine differences in time required to complete specific developmental stages and life cycle of Florida populations of these two species compared to *M. incognita* race 3 in growth chambers. To accomplish these objectives were determined the shortest time to reach different developmental stages at different temperatures, and the thermal-time requirements, expressed in degree-days, required by each species to develop from an infective J2 stage to a J3, J4, female, egg-laying female and second-generation J2.



## MATERIALS AND METHODS

*Preparation of plant materials:* Root penetration and development of *M. enterolobii*, *M. floridensis* and *M. incognita* race 3 were observed in tomato cv. BHN 589. Seeds were germinated under greenhouse conditions ( $21 \pm 8^\circ\text{C}$ ) in 38-cell seedling trays containing fine-grade vermiculite. Germinated seedlings were fertilized once weekly with 0.21% (w/v) 24N–8P–16K solution (Miracle-Gro; Scotts Miracle-Gro Products, Inc., Marysville, OH). Four- to five-leaf-stage seedlings were transplanted to 251-mL polystyrene foam cups filled with autoclaved sand (100% sand) after rinsing roots in running tap water to remove bits of vermiculite. Seedlings were maintained in environmental growth chambers for one week before initiating the experiment.

*Nematode culture and J2 collection:* The isolates of *M. enterolobii*, *M. floridensis* and *M. incognita* race 3 were multiplied on tomato cv. BHN 589 in the greenhouse ( $21 \pm 8^\circ\text{C}$ ). Species and race identification were confirmed using isozyme phenotypes (Dickson et al., 1971; Brito et al., 2008). Root systems of infected tomato were cut into pieces and macerated in a blender with water for 25 s, after which the suspension with roots and water was filtered through two sieves with 75- $\mu\text{m}$ -pore sieve stacked on 25- $\mu\text{m}$ -pore sieve to catch nematode eggs. The 50-mL filtered suspension was poured through a wire mesh lined with moist filter paper inside a 140-mm x 25-mm polystyrene petri dish. Second-stage juveniles (J2) were allowed to hatch at room temperature. The levels of nematode inoculum, obtained from J2 collections between 15 to 48 h, were 200 J2 per plant for *M. enterolobii* and *M. incognita*, and 100 J2 per plant for *M. floridensis*.

*Growth chamber conditions and plant maintenance:* The experiment was carried out in environmental growth chambers (Percival I-36LL; Percival Scientific, Perry, IA) fixed or alternated between  $30^\circ\text{C}$  and  $25^\circ\text{C}$  ( $30\text{--}25^\circ\text{C}$  : 12-h light period at  $30^\circ\text{C}$  and 12-h dark period

at 25°C) with lighting provided by fluorescent lamps ( $65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). The plants were watered individually with 40-ml water once a day or as needed and fertilized with 40 ml 0.21% (w/v) 24N–8P–16K solution with micronutrients (Miracle-Gro; Scotts Miracle-Gro Products, Inc., Marysville, OH) once every two weeks. Temperatures in each growth chamber were recorded with two pendant data loggers (HOBO MX2202; Onset Computer Corporation, Bourne, MA) set to record hourly averages from 5-min sampling intervals. Hourly temperatures were averaged from the two data loggers before calculating the degree-days as described below.

*Nematode inoculation, penetration, and life cycle observations:* Nematode inoculum were pipetted into three 2-cm-deep holes made around the stem base of the plant. After 48 h from inoculation, the seedlings were removed from container and sand around the roots was washed away under running tap water to eliminate non-penetrating juveniles. The seedlings were transplanted into a new autoclaved sand in 251-ml polystyrene foam cups and returned to the growth chambers. The nematode-infected plants were incubated up to 29 days in three growth chambers set at the before mentioned temperature regimes. Nematode development in tomato roots was examined at two-day intervals between 5 and 29 days after inoculation (DAI). At each time point, two infected plants were sampled to represent each of the three RKN species per temperature regime. Roots were gently rinsed under running water to remove any adhering sand. Following staining using the sodium-hypochlorite-acid-fuchsin method developed for staining nematodes in root tissue (Byrd et al., 1983), but using lactic acid instead of acetic acid in the staining solution, the number of nematodes at each developmental stage (Fig. 1 and 2) were counted. The number of J2 that penetrated at 5 DAI was used as a baseline for the calculation of the percentage of *M. enterolobii*, *M. floridensis* and *M. incognita* present in the root system. When globose females were detected for the first time, the succeeding root samples were stained with red food color (Thies et al., 2002) in

order to count the egg masses, which correspond to the number of egg-laying females, before clearing and staining with acid fuchsin for further examination. The stained whole root systems were immersed in glycerol and dissected individually under the stereomicroscope to examine nematodes at different developmental stages. To distinguish between J3 and J4, the nematodes were picked and mounted on glass slides (25 x 75 x 1 mm) for observation under the microscope at a 40x level of magnification.

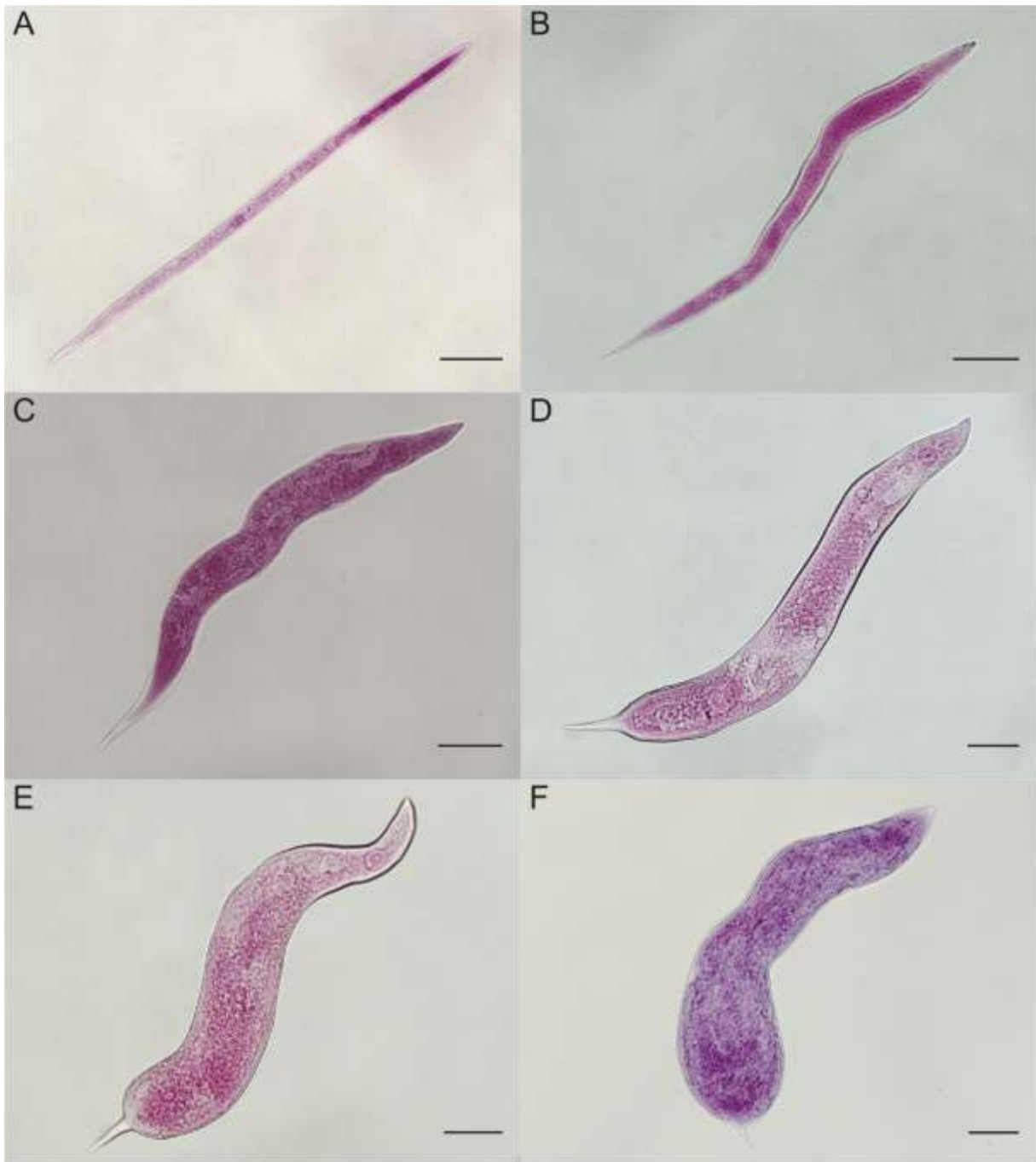


Fig. 1. Growth stages of second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* spp.; (A) vermiform, early J2 with no swelling; (B, C, D) midstage J2 with early swelling and conoid tail; and (E, F) late J2 with swollen body, rounded terminus. Scale bars: A-E = 50  $\mu$ m; and F= 10  $\mu$ m.

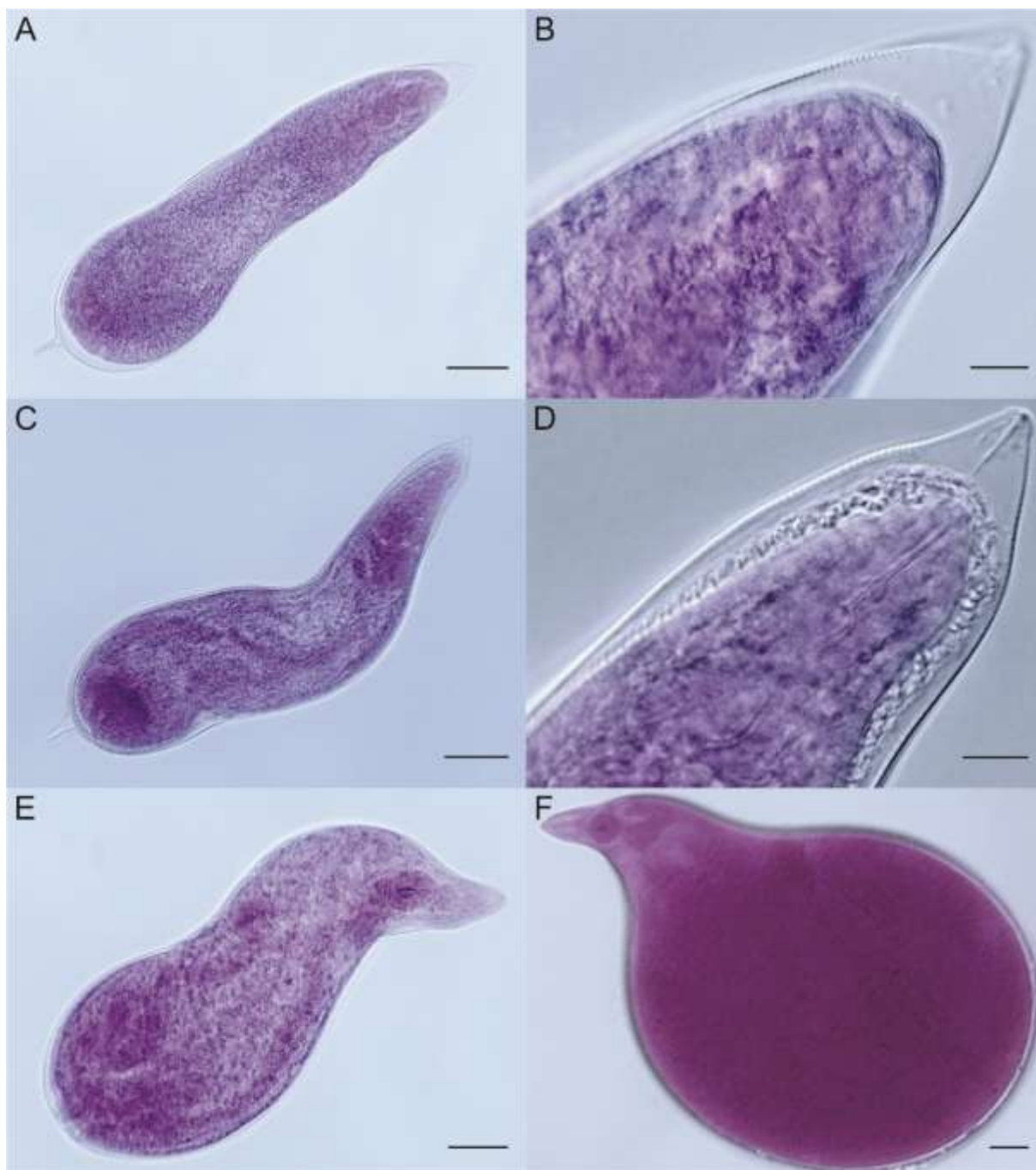


Fig. 2. Developmental stages of *Meloidogyne* spp.; (A) third-stage juvenile (J3); (B) anterior part of a J3; (C) fourth-stage juvenile (J4); (D) anterior part of a J4; (E) female; and (F) egg-laying globose female. Scale bars: A, E, and F = 50  $\mu$ m; B, C, and D = 10  $\mu$ m.

*Classification of nematode developmental stages:* The number of nematodes in each developmental stage was recorded. The individual nematodes were assigned to J2 stage (Fig. 1) and succeeding stages (Fig. 2) as J3, J4, female, egg-laying female, and new-generation

vermiform J2. The J2 present in the roots were classified further into three growth stages based on their body shape as follows: (i) vermiform with no swelling (early J2), (ii) midstage J2 with early swelling and conoid tail, and (iii) late J2 with swollen body, rounded terminus (Fig. 1). Third- and fourth-stage juveniles were distinguished based on the cuticle layers in the anterior part of their body as previously described (Triantaphyllou and Hirschmann, 1960; Dávila-Negrón and Dickson, 2013) (Fig. 2).

*Data analyses:* Data were analysed as a two-factor, completely randomized design with two observations during each sampling date. This resulted in 18 observations per sampling date. The percentage of nematodes in each developmental stage per sampling date was based on the total number of nematodes observed in the whole root system. To calculate the minimum accumulated degree-days (DD) for vermiform J2 to reach each successive developmental stage or to complete a generation, the daily difference between mean temperature in the growth chamber and the base temperature ( $T_b$ ) was summed over the number of DAI. The mean  $T_b$  of *M. incognita* was found to be 9.8°C when inoculated on okra (Dávila-Negrón and Dickson, 2013) and 10.1°C on tomato (Ploeg and Maris, 1999). There are no published data regarding  $T_b$  of *M. enterolobii* and *M. floridensis* but we suspect similarities with the heat requirements for *M. incognita* development and that of other tropical and subtropical RKN species (Ferris et al., 1978; Maleita et al., 2012); thus, we followed Tyler's (1933) calculation of heat units for RKN development, wherein each centigrade above 10°, acting for one hour, is counted as one effective unit. Data on numbers of penetrated J2 at 5 DAI were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) using SigmaPlot, Tukey's HSD test ( $P \leq 0.05$ ) was used to compare means.

## RESULTS

*Temperature on root penetration by second stage juveniles:* The percentage of J2 that penetrated the root system of tomato ranged from 15 to 33%. Root invasion of J2 in tomato roots was influenced by the temperature regime regardless of the species (Fig. 3). For all three species, the percentage of penetrated J2 at 5 DAI was greater at 30°C than at 25°C, and intermediate at 30-25°C ( $P = 0.022$ ).

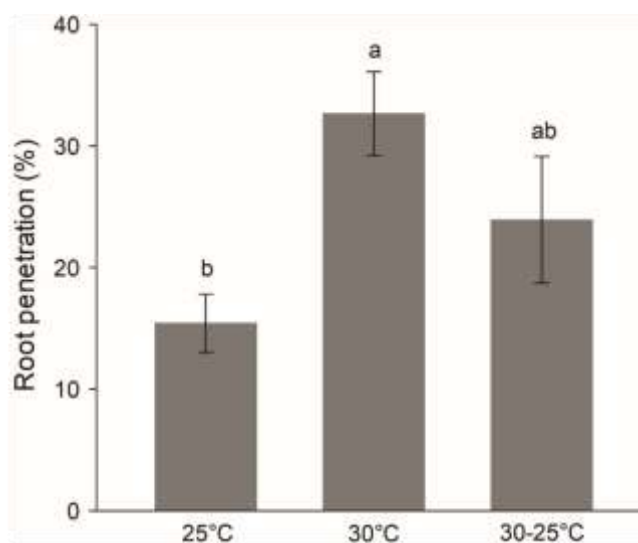


Fig 3. Percentage of root penetration at 5 days after inoculation (DAI) with *Meloidogyne* second-stage juveniles (J2) in tomato under different temperature regimes. Temperatures were fixed or alternated between 30° and 25°C (30-25°C: 12-h light period at 30°C and 12-h dark period at 25°C). Bars represent the grand means  $\pm$  SE of the three *Meloidogyne* species (*M. enterolobii*, *M. floridensis*, and *M. incognita* race 3). The percentage of penetrated J2 was based on the initial inoculum concentration and total number of nematodes observed into the whole root system at 5 DAI. Different letters over bars indicate significant differences based on Tukey's HSD test ( $P \leq 0.05$ ).

*Temperature on post-penetration development:* During the time span of 29 days, the developmental rates of *M. enterolobii*, *M. floridensis* and *M. incognita* varied in response to temperatures. Regardless of the species, only J2 were observed at 5 and 7 DAI under 25°C and 30-25°C temperature regimes. At 7 DAI, however, growth into J3 had already occurred for all three species under 30°C, two days ahead of those under 25°C and 30-25°C with

greater J3 numbers in the latter. At 11 DAI under 25°C, development into J4 and females occurred concomitantly with the increase in the numbers of J3. At 11 DAI under 30-25°C, however, there was a corresponding decrease in the numbers of J3 as they increasingly developed into J4 and females; the same occurred two days earlier (9 DAI) under 30°C. The percentage of females increased over time at all three temperatures, but it occurred faster, and the numbers were greater at 30°C (Fig. 4). Under 30°C, the number of females increased from 40 to 80% for *M. enterolobii* and 60 to 95% for *M. incognita* between 9 to 13 DAI, while for *M. floridensis* the increase of 70 to 80% occurred two days before (11 DAI). At 15 DAI under the same temperature, the number of females reached more than 90% for all three species. *M. floridensis* was the first to reach female stage (9 DAI) but for all three species egg-laying females were observed 17 DAI. Egg-laying females were first observed at 13 DAI under 30°C and at 17 DAI under 30-25°C for all three species, however, with greater numbers for *M. floridensis*. Under 25°C, egg-laying females were first seen at 21 DAI for *M. enterolobii*, and at 17 DAI for *M. floridensis* and *M. incognita*. Predominance of the egg-laying female stage was apparent at 17 DAI under 30°C for all three species, at 19 DAI under 30-25°C for *M. floridensis* and *M. incognita*, at 21 DAI under 30-25°C for *M. enterolobii*, at 23 DAI under 25°C for *M. enterolobii* and *M. floridensis*, and at 21 DAI under 25°C for *M. incognita*.



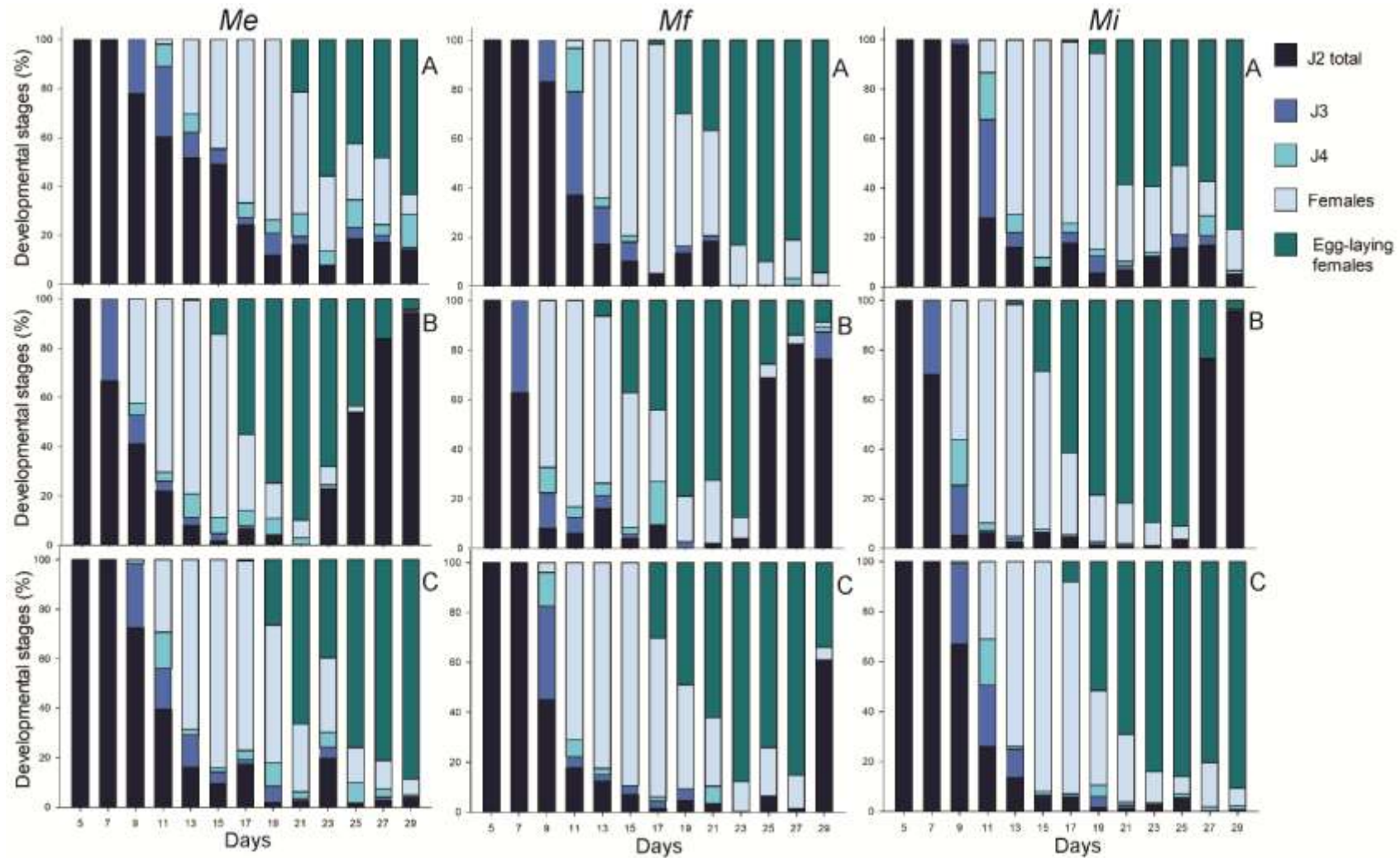


Fig. 4. Percentage of *M. enterolobii* (Me), *M. floridensis* (Mf) and *M. incognita* race 3 (Mi3) developmental stages on tomato in a growth chamber for 29 days after inoculation (DAI) under 25°C (A), 30°C (B) or 30-25°C (C; 12-h light period at 30°C and 12-h dark period at 25°C). Percentage of nematodes in each developmental stage was based on the total number of nematodes observed in the whole root system. The increase of the J2 under 30°C at 23 DAI for *M. enterolobii*, at 25 DAI for *M. floridensis* and *M. incognita*, and under 30-35°C at 29 DAI for *M. floridensis* represent the earliest observation of vermiform juveniles from the second-generation.

*Degree-days required to development and life cycle completion:* Cumulative days and accumulated degree-days (DD;  $T_b = 10^\circ\text{C}$ ) required for the first observation of each different development stage from infective J2 to new-generation vermiform J2 in tomato at  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , and  $30\text{-}25^\circ\text{C}$  are shown in Table 1. At  $25^\circ\text{C}$ , *M. enterolobii* required more DD (308.3) to reach egg-laying females compared to *M. incognita* and *M. floridensis* (248.1). At  $30^\circ\text{C}$ , the three species reached all developmental stages faster than in other temperatures (Fig. 4), but there was no difference in DD required to development from J3 to egg-laying female among species.

Under  $25^\circ\text{C}$  with 425.4 DD ( $T_b = 10^\circ\text{C}$ ), the three species were not able to complete their life cycle within 29 days based on the absence of new-generation of vermiform J2 in roots at 29 DAI (Table 1). Similar results were observed at  $30\text{-}25^\circ\text{C}$  for *M. enterolobii* and *M. incognita*, but not for *M. floridensis* wherein life cycle completion occurred at 29 DAI (468.8 DD). However, at  $30^\circ\text{C}$ , the three species completed the life cycle within 23 to 25 DAI with 506.9 DD for *M. enterolobii*, and 552.3 DD for *M. floridensis* and *M. incognita*. Under the same temperature, new vermiform juveniles from the second generation penetrated the roots after 12 days (266.6 DD<sub>30</sub>) for *M. floridensis* and *M. incognita*, and 10 days (221.2 DD) for *M. enterolobii* from the first occurrence of egg-laying females. Under  $30\text{-}25^\circ\text{C}$ , it occurred after 12 days (196.1 DD) for *M. floridensis*, but not for the other two species.

Table 1. Cumulative days and accumulated degree-days (DD) required for first observation of each developmental stage of *Meloidogyne enterolobii* (Me), *M. floridensis* (Mf) and *M. incognita* race 3 (Mi3) on tomato inoculated with second-stage juveniles at different temperatures.

| <i>Meloidogyne</i><br>spp. | Developmental<br>stages <sup>a</sup> | Temperature (°C) |                    |    |       |                    |       |
|----------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------|----|-------|--------------------|-------|
|                            |                                      | 25               |                    | 30 |       | 30-25 <sup>b</sup> |       |
| Me                         | J3                                   | 9 <sup>c</sup>   | 130.6 <sup>d</sup> | 7  | 152.6 | 9                  | 144.1 |
|                            | J4                                   | 11               | 159.4              | 9  | 195.7 | 9                  | 144.1 |
|                            | Female                               | 11               | 159.4              | 9  | 195.7 | 11                 | 176.1 |
|                            | Egg-laying female                    | 21               | 308.3              | 13 | 285.7 | 17                 | 272.7 |
|                            | New-vermiform J2                     | na <sup>e</sup>  | na                 | 23 | 506.9 | na                 | na    |
| Mf                         | J3                                   | 9                | 130.6              | 7  | 152.6 | 9                  | 144.1 |
|                            | J4                                   | 11               | 159.4              | 9  | 195.7 | 9                  | 144.1 |
|                            | Female                               | 11               | 159.4              | 9  | 195.7 | 9                  | 144.1 |
|                            | Egg-laying female                    | 17               | 248.1              | 13 | 285.7 | 17                 | 272.7 |
|                            | New-vermiform J2                     | na               | na                 | 25 | 552.3 | 29                 | 468.8 |
| Mi3                        | J3                                   | 9                | 130.6              | 7  | 152.6 | 9                  | 144.1 |
|                            | J4                                   | 11               | 159.4              | 9  | 195.7 | 9                  | 144.1 |
|                            | Female                               | 11               | 159.4              | 9  | 195.7 | 11                 | 176.1 |
|                            | Egg-laying female                    | 17               | 248.1              | 13 | 285.7 | 17                 | 272.7 |
|                            | New-vermiform J2                     | na               | na                 | 25 | 552.3 | na                 | na    |

<sup>a</sup> J3 = third-stage juvenile; J4 = fourth-stage juvenile; new-vermiform J2 = second-stage vermiform juvenile from the second-generation.

<sup>b</sup> Temperature alternated between 30°C and 25°C (12-h light period at 30°C and 12-h dark period at 25°C).

<sup>c</sup> Cumulative days.

<sup>d</sup> Accumulated degree-days above a threshold temperature [base temperature ( $T_b = 10^\circ\text{C}$ )].

<sup>e</sup> na = none observed within the 29-day period.

## DISCUSSION

The invasion of *M. enterolobii*, *M. floridensis* and *M. incognita* on tomato roots was affected by the temperature and the highest numbers were observed at 30°C than at 25°C or at the intermediate temperature (30-25°C: 12-h light period at 30°C and 12-h dark period at 25°C). The invasion in host roots require considerable activity by the J2 and elevated

temperatures would increase their activity (Tyler, 1933) up to a certain threshold, beyond which would be harmful or lethal to the juveniles (Wang and McSorley, 2008).

The results observed in this study indicated that the three species accelerate their developmental rate with the increasing temperature and there was no difference between their development at 30°C while at 25°C and 30-25°C their development stages were delayed. In this study, higher temperature (30°C) reduced the number of days to reach J3, J4, females and egg-laying females whereas lower temperature (25°C) delayed J2 development into succeeding stages. This is supported by another studies on *M. incognita* (Dávila-Negrón and Dickson, 2013; Vela et al., 2014).

Egg-laying females were observed 13 DAI at 30°C for all three species in accordance with previous findings for *M. incognita* on tomato at the same temperature (Davide and Triantaphyllou, 1967), but differed by two days (15 DAI) in another study on okra plants (Dávila-Negrón and Dickson, 2013). In the present study, egg-laying female stage was predominant at 17 DAI at 30°C for all three species and reached 90% between 21-25 days. Dávila-Negrón and Dickson (2013) reported for *M. incognita* at the same temperature a smaller number of egg-laying female (60%) by the end of their observation (31 days), however, the differences in these results may be related to the different nematode population and to the host used in our experiment.

The duration of the life cycle of *M. enterolobii*, *M. floridensis* and *M. incognita* was affected by temperature as reported for other RKNs (Zhang and Schmitt, 1995; Ploeg and Maris, 1999; Maleita et al., 2012; Khan et al., 2014; Vela et al., 2014). For *M. incognita* the life cycle (from J2 to J2) was completed on tomato plants in 20 and 27 days at average temperature of 30°C and 25°C, respectively (Ploeg and Maris, 1999). In the present study, *M. incognita* was able to complete its life cycle in 25 days at 30°C, but not at 25°C within our

timeframe of 29 DAI. *Meloidogyne floridensis* also completed its life cycle in 25 days at 30°C whereas *M. enterolobii* completed it at 23 DAI. Variation in the temperature (30-25°C) affected the length of the life cycle for the three species by delaying their development. At the alternated temperature (30-25°C), only *M. floridensis* completed it at 29 DAI when new-generation vermiform J2 were observed in the roots. These findings may be attributed in differences in days required for embryogenesis and hatching of the juveniles from the eggs (Dávila-Negrón and Dickson, 2013). As far as the authors are aware, this is the first report of the development and duration of *M. enterolobii* and *M. floridensis* life cycle completion on tomato, but more research is needed to investigate them at lower temperatures in a broader timespan.

The base temperature ( $T_b$ ) and thermal requirements or degree-days (DD) have varied among studies on development and life cycle of root-knot nematodes because of adaptation of each to its environment (Trudgill et al., 2005). The calculated values of  $T_b$  and DD for egg mass formation on tomato ( $T_b = 9.8$ , DD = 300; Dávila-Negrón and Dickson, 2013) and on cucumber ( $T_b = 12.2$ , DD = 294; Giné et al., 2014) were reported for *M. incognita*. These results lie between those found in the present work for *M. incognita*, taking 10°C as base temperature for calculating the DD (Tyler, 1933; Trudgill, 1995), and that were quite similar for both *M. enterolobii* and *M. floridensis* (DD = 248-308). Regarding to the life cycle, similar values were also reported for *M. incognita* ( $T_b = 10.1$ , DD = 400; Ploeg and Maris, 1999), *M. javanica* and *M. hapla* ( $T_b = 12.9$ , DD = 350;  $T_b = 8.25$ , DD = 554, respectively; Trudgill and Perry, 1994) and *M. hispanica* ( $T_b = 10.22$ , DD = 515.46; Maleita et al., 2012) on tomato and for *M. incognita* and *M. javanica* in cucumber ( $T_b = 11.4$ , DD = 500; Giné et al., 2014). To our knowledge, the information for *M. enterolobii* and *M. floridensis* is presented here for the first time. In this paper, taking 10°C as  $T_b$ , the values of DD calculated for the three species (*M. enterolobii* = 506.9; *M. floridensis* and *M. incognita* = 552.3) were

similar to the values observed for the species above. These results suggest that regarding temperature both species may develop at similar environments as *M. incognita*, the most widespread root-knot nematode worldwide.

## LITERATURE CITED

Brito, J. A., Ramandeep, K., Cetintas, R., Stanley, J. D., Mendes, M. L., McAvoy, E. J., Powers, T. O., and Dickson, D. W. 2008. Identification and isozyme characterization of *Meloidogyne* spp. infecting horticultural and agronomic crops and weed plants in Florida. *Nematology* 10:757-766.

Brito, J. A., Stanley, J. D., Cetintas, R., Hamill, J., and Dickson, D. W. 2005. A new root-knot nematode infecting vegetables in Florida. *Journal of Nematology* 37:359-360 (Abstr.).

Brito, J. A., Stanley, J. D., Kaur, R., Cetintas, R., Di Vito, M., Thies, J. A., and Dickson, D. W. 2007. Effects of the *Mi-1*, *N* and *Tabasco* genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *Journal of Nematology* 39:327-332.

Brito, J. A., Vau, S. J., and Dickson, D. W. 2014. Host status of selected sweet potato cultivars to *Meloidogyne enterolobii*. *Journal of Nematology* 46:140 (Abstr.).

Byrd, Jr., D.W., Kirkpatrick, T. and Barker, K. R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142-143.

Carneiro, R. M. D. G., Moreira, W. A., Almeida, M. R. A., and Gomes, A. C. M. M. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. *Nematologia Brasileira* 25:223-228.

Castagnone-Sereno, P. 2012. *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging, highly pathogenic, root knot-nematode species. *Nematology* 14:133-138.

Church, G. T. 2007. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne floridensis* on tomato (*Lycopersicon esculentum*) in Florida. *Plant Disease* 89:527.

Davide, R. G., and Triantaphyllou, A. C. 1967. Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes. I. Effect of infection density, age of the host plant and soil temperature. *Nematologica* 13:102-110.

Dávila, M., Allen, L. H., and Dickson, D. W. 2005. Influence of soil temperatures under polyethylene mulch and bare soil on root-knot nematode egg laying. *Journal of Nematology* 37:364-365 (Abstr.).

Dávila-Negrón, M., and Dickson, D. W. 2013. Comparative thermal-time requirements for development of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica*, at constant temperatures. *Nematropica* 43:152-163.

Dickson, D. W., Huisling, D., and Sasser, J. N. 1971. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, and *Aphelenchus* spp. *Journal of Nematology* 3:1-16.

Fargette, M., and Braaksma, R. 1990. Use of the esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. 3. A study of some “ B ” race lines and their taxonomic position. *Revue de Nématologie* 13:375-386.

Ferris, H., Du Vernay, H. S., Small, R. H. 1978. Development of a soil-temperature data base on *Meloidogyne arenaria* for a simulation model. *Journal of Nematology* 10:39-42.

Giné, A., López-Gómez, M., Vela, M. D., Ornat, C., Talavera, M., Verdejo-Lucas, S., and Sorribas, F.J. 2014. Thermal requirements and population dynamics of root-knot nematodes on cucumber and yield losses under protected cultivation. *Plant Pathology* 63:1446-1453.



Handoo, Z. A., Nyczepir, A. P., Esmenjaud, D., van der Beek, J. G., Castagnone-Sereno, P., Carta, L. K., Skantar, A. M., and Higgins, J. A. 2004. Morphological, molecular, and differential-host characterization of *Meloidogyne floridensis* n. sp. (Nematode: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peach in Florida. *Journal of Nematology* 36:20-35.

Khan, A., Wesemael, W., and Moens, M. 2014. Influence of temperature on the development of the temperate root-knot nematodes *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Russian Journal of Nematology* 22:1-9.

Kiewnick, S., Dessimoz, M., and Franck L. 2009. Effects of the *Mi-1* and the *N* root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *Journal of Nematology* 41:134-139.

Madulu, J. D., and Trudgill, D. L. 1994. Influence of temperature on the development and survival of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 40:230-243.

Maleita, C., Curtis, R., and Abrantes, I. 2012. Thermal requirements for the embryonic development and life cycle of *Meloidogyne hispanica*. *Plant Pathology* 61:1002-1010.

Nyczepir, A. P., Esmenjaud, D., and Eisenback, J. D. 1998. Pathogenicity of *Meloidogyne* sp. (FL-isolate) on *Prunus* in the southeastern United States and France. *Journal of Nematology* 30:509 (Abstr.).

Ploeg, A. T., and Maris, P. C. 1999. Effects of temperature on the duration of the life cycle of a *Meloidogyne incognita* population. *Nematology* 1:389-393.

Reighard, G. L., Henderson, W. G., Scott, S. O., and Subbotin, S. A. 2019. First report of the root-knot nematode, *Meloidogyne floridensis* infecting Guardian® peach rootstock in South Carolina, USA. *Journal of Nematology* 51:1-3.

Rutter, W. B., Skantar, A. M., Handoo, Z. A., Mueller, J. D., Aultman, S. P., and Agudelo, P. 2019. *Meloidogyne enterolobii* found infecting root-knot nematode resistant sweet potato in South Carolina, United States. *Plant Disease* 103:775.

Sharpe, R. H., Hesse, C. O., Lownsberry, B. A., Perry, V. G., and Hansen, C. J. 1969. Breeding peaches for root-knot nematode resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 94:209-212.

Sherman, W. B., Lyrene, P. M., and Sharpe, R. H. 1991. Flordaguard peach rootstock. *Hort Science* 26:427-428.

Smith, T., Brito, J.A., Han, H., Kaur, R., Cetintas, R., and Dickson, D.W. 2015. Identification of the peach root-knot nematode, *Meloidogyne floridensis*, using mtDNA PCR-RFLP. *Nematropica* 45:138-143.

Subbotin, S. A. 2019. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Nematology* 21:243-251.

Thies, J. A., Merrill, S. B., and Corley, E. L. 2002. Red food coloring stain: new, safer procedures for staining nematodes in roots and egg masses on root surfaces. *Journal of Nematology* 34:179-181.

Thompson, J.P., Clewett, T.G., and O'Reilly, M.M. 2015. Temperature response of root-lesion nematode (*Pratylenchus thornei*) reproduction on wheat cultivars has implications for resistance screening and wheat production. *Annals of Applied Biology* 167:1-10.

Triantaphyllou, A. C., and Hirschmann, H. 1960. Post-infection development of *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 (Nematoda: Heteroderidae). *Annales de L'Institut Phytopathologique Benaki* 3:1-11.

Trudgill, D. L. 1995. An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. *Fundamental and Applied Nematology* 18:407-417.

Trudgill, D. L., Honek, A., Li, D., and Van Straalen, N. M. 2005. Thermal time - concepts and utility. *Annals of Applied Biology* 146:1-14.

Trudgill, D. L., and Perry, J. N. 1994. Thermal time and ecological strategies – a unifying hypothesis. *Annals of Applied Biology* 125:521-532.

Tyler, J. 1933. Development of the root-knot nematode as affected by temperature. *Hilgardia* 7:391-415.

Vela, M. D., Giné, A., López-Gómez, M., Sorribas, F. J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., and Talavera, M. 2014. Thermal time requirements of root-knot nematodes on zucchini-squash and population dynamics with associated yield losses on spring and autumn cropping cycles. *European Journal of Plant Pathology* 140:481-490.

Villar-Luna, E., Gómez-Rodríguez, O., Rojas-Martínez, R. I., and Zavaleta-Mejía, E. 2016. Presence of *Meloidogyne enterolobii* on Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa, Mexico. *Helminthologia* 53:155-160.

Wang, K.-H., and McSorley, R. 2008. Exposure time to lethal temperatures for *Meloidogyne incognita* suppression and its implication for soil solarization. *Journal of Nematology* 40:7-12.

Westphal, A., Maung, Z. T. Z., Doll, D. A., Yaghmour, M. A., Chitambar, J. J., and Subbotin, S. A. 2019. First report of the peach root-knot nematode, *Meloidogyne floridensis* infecting almond on root-knot nematode-resistant ‘Hansen 536’ and ‘Bright’s Hybrid 5’ rootstocks in California, USA. *Journal of Nematology* 51:1-3.

Yang, B., and Eisenback, J. D. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China. *Journal of Nematology* 15:381-391.

Yeon, I. K., Kim, D. G., and Park, S. D. 2003. Soil temperature and egg mass formation by *Meloidogyne arenaria* on oriental melon (*Cucumis melo* L.). *Nematology* 5:721-725.

Zhang, F., and Schmitt, D. P. 1995. Embryogenesis and postinfection development of *Meloidogyne konaensis*. *Journal of Nematology* 27:103-108.