



ROBERTA MENDES ISAAC FERREIRA VILELA

**GALHAS DE NEMATOIDES EM HORTALIÇAS:
ESTABELECIMENTO, DESENVOLVIMENTO, IMPACTOS NAS
CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E BIOCONTROLE**

**LAVRAS – MG
2022**

ROBERTA MENDES ISAAC FERREIRA VILELA

**GALHAS DE NEMATOIDES EM HORTALIÇAS: ESTABELECIMENTO,
DESENVOLVIMENTO, IMPACTOS NAS CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E
BIOCONTROLE**

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

Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães
Coorientador

**LAVRAS – MG
2022**

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

Vilela, Roberta Mendes Ferreira Isaac.

Galhas de nematoides em hortaliças: estabelecimento e desenvolvimento, impactos nas características agronômicas e biocontrole / Roberta Mendes Ferreira Isaac Vilela. 2022.

134p. : il.

Orientador: Denis Coelho de Oliveira.

Coorientador: Thiago Alves Magalhães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Galhas de nematoides. 2. Anatomia de galhas e parede celular. 3. Controle biológico de nematoides. I. Oliveira, Denis Coelho de. II. Magalhães, Thiago Alves. III. Título.

ROBERTA MENDES ISAAC FERREIRA VILELA

**GALHAS DE NEMATOIDES EM HORTALIÇAS: ESTABELECIMENTO,
DESENVOLVIMENTO, IMPACTOS NAS CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E
BIOCONTROLE**

**NEMATOID GALLS IN VEGETABLES: ESTABLISHMENT, DEVELOPMENT,
IMPACTS ON AGRONOMIC CHARACTERISTICS AND BIOCONTROL**

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

APROVADA em 24 de fevereiro de 2022.

Dra. Marinês Ferreira Pires Lira	UFLA
Dra. Rosy Isaias	UFMG
Dra. Franscinely Aparecida de Assis	Unicerrado
Dr. Diego Ismael Rocha	UFV

Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães
Coorientador

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos e toda proteção nesses anos de estrada.

Agradeço aos meus pais pela base e formação e por estarem sempre presentes.

Agradeço ao meu esposo Cláudio Vilela, meu companheiro de vida, que não mediu esforços para que eu fizesse o mestrado e doutorado, que me ajudou, apoiou e foi meu grande incentivador, você foi muito importante nessa trajetória. Obrigada meu amor!

Agradeço meu orientador Denis Oliveira, pela parceria dos últimos seis anos, pelos ensinamentos, por todo o conhecimento que foi passado. Obrigado pelo exemplo! Eu me espelho muito em você e na Ana Sílvia. Graças a você melhorei como docente, como orientadora e pesquisadora.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras pela chance de cursar o doutorado, ao professores Thiago Magalhães pelo apoio, e por toda ajuda quando eu estava em Lavras, aos professores Marinês e Evaristo que me acolheram tão bem na Universidade, tenho muita gratidão a vocês três.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, em especial ao LADEVI pela estrutura disponibilizada para fazer minhas pesquisas, ao professor Vinícius Kuster pela parceria desde o mestrado, pela amizade e por deixar meus trabalhos mais bonitos, ao Vitor Martini por me auxiliar nas estatísticas e nos trabalhos. Valeu demais! Estendo o agradecimento aos colegas do laboratório pela companhia e pela ajuda.

Agradeço ao Unicerrado por todo apoio, e aos amigos professores que me ajudaram em algum momento.

Agradeço aos professores que compõe a banca, pela disponibilidade. Tenho certeza de que vão contribuir muito com o trabalho.

Agradeço a CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG por tornar possível a realização desse trabalho, por meio do auxílio financeiro a essa pesquisa.

Sozinhos vamos mais rápido, mas acompanhados vamos mais longe, se cheguei aqui, foi com a ajuda das pessoas especiais que citei acima!!!

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

A produção de hortaliças é afetada por nematoides, sendo o *Meloidogyne* spp. (nematóide de galhas), um dos maiores causadores de perdas nas olerícolas. Esse parasita é responsável por uma das mais complexas relações parasito/hospedeiro, em função da indução de sítios de alimentação que funcionam como dreno biológico e formação de galhas com formatos e tamanhos distintos, sendo o principal sintoma da infecção. Na presente pesquisa é apresentada em quatro artigos como os nematoides de galhas podem afetar o desenvolvimento das culturas do quiabeiro (*Meloidogyne incognita*), alface (*M. javanica*), salsinha (*M. incognita*) e jiloeiro (*M. incognita*), mostrando os impactos estruturais causados na anatomia da raiz pela indução das células gigantes que formam o sítio de alimentação. Nas culturas do quiabeiro e alface não houve prejuízo do seu desenvolvimento causado pelo nematóide de galhas enquanto as culturas da salsinha e jiloeiro inoculadas tiveram seu desenvolvimento afetado por esse parasita. As galhas já eram detectadas após 18 DAI nas quatro culturas analisadas, sendo menores em alface e salsinha e maiores no quiabeiro e jiloeiro, células gigantes e o sítio de alimentação também já eram notados nessa época, promovendo a desorganização do sistema vascular. Foi investigada nestas culturas as alterações na parede celular em relação a compostos pécticos e hemicelulósicos na formação das células gigantes. Nas culturas da alface e jiloeiro foi avaliado se os produtos biológicos utilizando fungos (*Trichoderma harzianum* ou *Paecilomyces lilacinus*, respectivamente) seriam efetivos no controle dos nematoides de galhas *M. javanica* ou *M. incognita*, respectivamente. Neste estudo o *T. harzianum* não foi efetivo no controle do nematóide nessa cultivar de alface, enquanto o fungo *P. lilacinus auxiliou* o jiloeiro a suportar melhor o parasitismo e reduziu a quantidade de galhas e nematoides. Os resultados fornecem novas perspectivas para o entendimento da alimentação dos nematoides nas células gigantes, especialmente frente às alterações na estrutura da parede celular, além de mecanismo de biocontrole da praga.

Palavras-chave: Anatomia. Células gigantes. *Meloidogyne*. Olerícolas. Parede celular.

GENERAL ABSTRACT

Vegetable production is affected by nematodes, with *Meloidogyne* spp. (knot nematode), one of the main causes of losses in vegetable crops. This parasite is responsible for one of the most complex parasite/host relationships, due to the induction of feeding sites that function as a biological drain and the formation of galls with different shapes and sizes, being the main symptom of the infection. The present research presents in four articles how root-knot nematodes can affect the development of okra (*Meloidogyne incognita*), lettuce (*M. javanica*), parsley (*M. incognita*) and jiloeiro (*M. incognita*) crops, showing the impacts structural changes caused in the root anatomy by the induction of the giant cells that form the feeding site. In the cultures of okra and lettuce, there was no damage to their development caused by the root-knot nematode, while the inoculated cultures of parsley and eggplant had their development affected by this parasite. The galls were already detected after 18 DAI in the four cultures analyzed, being smaller in lettuce and parsley and larger in okra and eggplant, giant cells and the feeding site were also already noticed at that time, promoting the disorganization of the vascular system. Changes in the cell wall in relation to pectic and hemicellulosic compounds in the formation of giant cells were investigated in these cultures. In lettuce and eggplant crops, it was evaluated whether biological products using fungi (*Trichoderma harzianum* or *Paecilomyces lilacinus*, respectively) would be effective in controlling the root-knot nematodes *M. javanica* or *M. incognita*, respectively. In this study, *T. harzianum* was not effective in controlling the nematode in this lettuce cultivar, while the fungus *P. lilacinus* helped the eggplant to better withstand the parasitism and reduced the number of galls and nematodes. The results provide new perspectives for the understanding of nematode feeding in giant cells, especially in the face of changes in cell wall structure, as well as the pest biocontrol mechanism.

Keywords: Anatomy. Giant cells. *Meloidogyne*. Vegetables. Cell wall.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	8
1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 <i>Meloidogyne</i> spp. em hortaliças e alternativas de controle.....	10
2.2 Ciclo de <i>Meloidogyne</i> spp. e impacto estrutural nas raízes hospedeiras	12
2.3 Estrutura da parede celular e suas alterações em resposta a infecção por nematoides.....	15
3 PERSPECTIVAS	17
REFERÊNCIAS	18
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	26
ARTIGO 1 – IMPACT OF <i>Meloidogyne incognita</i> (NEMATODE) INFECTION ON ROOT TISSUES AND CELL WALL COMPOSITION OF OKRA (<i>Abelmoschus esculentus</i> L. Moench, MALVACEAE)	26
ARTIGO 2 – THE ROOT-KNOT NEMATODE <i>Meloidogyne javanica</i> INFECTION ON <i>Lactuca sativa</i> (ASTERACEAE): IMPACTS ON THE AGRONOMIC TRAITS, ROOT AND GALL DEVELOPMENT, AND USE OF <i>Trichoderma harzianum</i> (ASCOMYCOTA) AS BIOCONTROL	49
ARTIGO 3 – HOW THE ROOT-KNOT NEMATODE <i>Meloidogyne incognita</i> AFFECTS THE DEVELOPMENT AND ANATOMICAL STRUCTURE AND PARSLEY <i>Petroselinum crispum</i> (Mill.)?	73
ARTIGO 4 – GALHAS INDUZIDAS POR <i>Meloidogyne incognita</i> NO JILOEIRO (<i>Solanum gilo</i> Raddi): IMPACTO ESTRUTURAL E NOS PARÂMETROS FITOTÉCNICOS E AINDA CONTROLE COM <i>Paecilomyces lilacinus</i>	102

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Na produção de hortaliças, alguns fatores abióticos e bióticos podem afetar a produtividade, e entre os fatores bióticos se destacam as doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e, em especial, os nematoides (PINHEIRO; AMARO; PEREIRA, 2010).

Os nematoides de galhas *Meloidogyne* spp., tem ampla distribuição geográfica e podem infectar vasta gama de hospedeiros (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001). Desta forma constituem um dos fatores limitantes à produção de olerícolas no Brasil (BARROS et al., 2018), podendo levar a perdas de rendimento que chegam a 30% (ANWAR; MCKENRY; LEGARY, 2009) nas cultivares de maior susceptibilidade (PINHEIRO; AMARO; PEREIRA, 2010; ALVES et al., 2015). As espécies de *Meloidogyne* mais disseminadas são o *M. incognita* e *M. javanica*, grandes causadores de prejuízos às hortaliças (ROSA; WESTERICH; WILCKEN, 2013). Estas espécies são polípagas e cada uma pode infectar mais de 1.000 espécies de plantas hospedeiras já conhecidas (OLIVEIRA et al., 2018). O nematoide de galhas apresenta seis estágios de ovo a adulto, sendo que apenas o juvenil J2 é a forma infectante e móvel, que recém-eclodida procura raízes das plantas hospedeiras por quimiotaxismo (FRAGOSO et al., 2007). Após a infecção, os próximos estágios J3, J4 e adulto ocorrem dentro da raiz da planta (FERNANDES, 2020), a fêmea torna-se sedentária e estabelece um sítio de alimentação, induzindo a formação de células gigantes e galhas (HELLER et al., 2019).

A galha nas raízes é o principal sintoma de infecção por nematoides na planta hospedeira. Desenvolve-se a partir da hipertrofia e hiperplasia de células do parênquima vascular e cortical devido a secreções esofagianas do nematoide das galhas (CORDEIRO et al., 2005; JAMMES et al., 2005). As células gigantes são essenciais para o desenvolvimento e reprodução do nematoide (SÁ, 2011), assumindo papel de dreno metabólico (FERRAZ; BROWN, 2016). Essas células são selecionadas e modificadas por secreções esofagianas do J2, e em torno de 5 a 7 células, constituem o sítio de alimentação do nematoide de galhas (LEITE, 2020). Apresentam grande quantidade de núcleos, proliferação de organelas celulares (VOVLAS et al., 2005), pequenos vacúolos e parede celular com invaginações (VILELA et al., 2019).

A parede celular desempenha funções importantes nas plantas, uma delas é servir como barreira contra microrganismos. É constituída de polímeros de carboidratos, como

hemiceluloses, celuloses, pectinas e proteínas da parede (SÁ, 2011). Os processos de síntese e modificações da parede celular ainda são parcialmente compreendidos (BACETE et al., 2018), porém já se sabe que nas células gigantes a parede celular passa por processo de espessamento e afrouxamento para permitir a expansão e suporte para alimentação do nematoide (MEIDANI et al., 2019).

O conhecimento da função de diferentes componentes da parede celular e como eles interagem com estímulos exógenos, como patógenos e estresse ambiental, podem juntamente com outros estudos elucidar nos processos de resistência ou tolerância a estresse buscando melhores rendimentos (HOUSTOUN et al., 2016) e, com auxílio de técnicas de controle dos nematoides, minimizar perdas nas culturas.

Dessa forma, a utilização combinada dos métodos de controle no manejo integrado, a exemplo do uso de cultivares resistentes, plantas antagonistas, adubação verde, rotação de culturas, bem como os controles químico e biológico (BARKER; KOENNING, 1998), auxiliam na redução da infestação dos nematoides, bem como dos prejuízos. O controle biológico tem sido apresentado como vantajoso por não deixar resíduos que contaminem o meio ambiente, e por contar com uma vasta diversidade de inimigos naturais dos nematoides, com destaque para os fungos (NUNES, 2008).

Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito no nematoide do desenvolvimento das seguintes hortaliças (quiabeiro, alface, salsinha e jiloeiro); as modificações estruturais na anatomia da raiz infestadas por esse parasita e ainda se o controle biológico pode auxiliar no controle do nematoide de galhas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Meloidogyne* spp. em hortaliças e alternativas de controle

Os nematoides de galhas podem afetar hortaliças como alface (*Lactuca sativa* L.) Asteraceae, quiabo (*Abelmoschus esculentus*) Malvaceae, salsinha (*Petroselinum crispum* Mill.) e outras apiáceas como coentro, cenoura. O jiloeiro (*Solanum gilo*) e outras solanaceas como a batata inglesa, pimentas, pimentão, jiló, berinjela e tomate. E também a batata-doce, da família Convolvulaceae, a beterraba da Amaranthaceae, e ainda as cucurbitáceas (abóboras, abobrinhas, melão, morangas e pepino) (PINHEIRO; MELO; RAGASSI, 2019), dentre outras, comumente cultivadas por pequenos e médios agricultores.

Na cultura do quiabeiro (Malvaceae) os danos podem chegar a 100%, dependendo do nível populacional de nematoides, visto que estes debilitam o sistema radicular das plantas que apresentam queda drástica do vigor, redução do tempo de colheita, da quantidade e tamanho de frutos (ROSSI et al., 2017). As espécies de maior destaque nessa cultura são os nematoides de galhas *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, que causam sérios prejuízos, por ser uma cultura muito susceptível, ela pode ser utilizada até mesmo como indicadora da existência do nematoide *Meloidogyne* spp. nas áreas de produção (PINHEIRO et al., 2013).

A alface também é acometida por fitonematoides (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010), com destaque para *M. incognita* e *M. javanica* (PINHEIRO, 2017). Nessa cultura os nematoides podem causar injúria no sistema radicular, tais como redução de volume e tamanho de raízes e formação de galhas, e na parte aérea diminuição na quantidade e qualidade das folhas, o que impacta na comercialização (FERRAZ; BROWN, 2016; SILVA, 2021). As cultivares do tipo lisa são as mais suscetíveis aos nematoides (CHARCHAR; MOITA, 1996). Na alface, o controle químico dos nematoides de galhas com nematicidas não é recomendado, em função do ciclo curto da cultura e pela falta de registro de produto químico específico para alface no Brasil (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS - AGROFIT/MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2022). Desta forma, faz-se necessários estudos para aplicação do controle biológico, com produtos a base de fungos, durante a produção dessa cultura.

Os nematoides causam grandes perdas no cultivo de apiáceas (PINHEIRO; FERREIRA; PEREIRA, 2012), sendo que nas culturas do coentro e da salsinha se destacam os nematoides das galhas, principalmente *M. incognita*, e o reniforme *Rotylenchus reniformis* (PINHEIRO; PEREIRA, 2016). Nas solanáceas, o jiloeiro apresentou susceptibilidade a

Meloidogyne como observaram Macêdo, Pinheiro e Mendonça (2016), sendo que dos 31 genótipos de jiló avaliados para resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*, todos apresentaram susceptibilidade.

O plantio de hortaliças nas áreas contaminadas por nematoide pode elevar o nível do inoculo no solo e favorecer a sua disseminação, o que impacta na agricultura da região (ALVES et al. 2015). No Maranhão um levantamento em áreas produtoras de hortaliças mostrou a presença de *M. incognita* em quase 74% das áreas amostradas (SILVA, 1991). Na Região Sul de Goiás, em Joviânia, nematoides de galhas também foram encontradas em hortaliças como alface e repolho (SILVA et al., 2012). Depois de introduzidos em uma área agrícola é praticamente impossível a erradicação dos nematoides de galhas por serem de difícil manejo (NIÑO CASTAÑEDA, 2015). Como não existe registro de nematicidas para a grande maioria das hortaliças cultivadas (AGROFIT/MAPA, 2022), acabam sendo utilizados produtos não registrados, que são tóxicos, e com residual longo em relação ao ciclo das hortaliças, podendo contaminar o consumidor ao utilizar as hortaliças *in natura* (PINHEIRO; MELO; RAGASSI, 2019).

Diante disso, devem ser adotadas de modo integrado algumas estratégias como a rotação/sucessão com culturas não hospedeiras (DIAS et al., 2010), evitar a entrada do nematoide na área, adubação verde (CHINELATO, 2019) e solarização do solo. Contudo, a associação dessas medidas com o controle biológico seria desejável, com o objetivo de reduzir as perdas a níveis toleráveis, sem causar grandes interferências no ambiente (MIZUBUTI; MAFFIA, 2001).

Atuando como antagonistas a nematoides, os microrganismos mais empregados na agricultura são fungos e bactérias (STIRLING, 1991; VAZ et al., 2011). Os fungos do gênero *Trichoderma* têm mostrado resultados no controle de nematoides (MUKHTAR; TARIQ-KHAN; ASLAM, 2021) e apesar do seu principal modo de ação ser por meio da produção de compostos tóxicos, há relatos sobre o parasitismo de ovos de nematoides (SHARON et al. 2001; EAPEN; BEENA; RAMANA, 2005) e na produção de enzimas com aplicações industriais, como polissacaridases, proteases e lipases. Essas enzimas na natureza estão envolvidas na degradação da parede celular de patógenos de plantas (HJELJORD; GRUNDLER; SIDDIQUE, 2001). O *Paecilomyces lilacinus* também tem sido utilizado no biocontrole de forma eficiente, caracterizado como um fungo saprófito, oportunista, que parasita ovos e cistos, capaz de utilizar grande quantidade de substratos, tendo ainda pouca especificidade de hospedeiros (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980; GOETTEL et al., 2001).

Com base no exposto, frente ao grande número de cultivares e genótipos de hortaliças susceptíveis, estudos que determinam impactos da infecção dos nematoides em características agriculturáveis ainda são necessários, especialmente aqueles que descrevem o desenvolvimento das galhas e o tempo de formação dos sítios de alimentação das células gigantes.

2.2 Ciclo de *Meloidogyne* spp. e impacto estrutural nas raízes hospedeiras

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematoide de galhas, são endoparasitas sedentários obrigatórios das raízes de diversas plantas (ABAD et al., 2003; CASTAGNONE-SERENO, 2006). Estes organismos também são considerados como os mais prejudiciais as culturas pelos nematologistas (JONES et al., 2013), sendo 98 espécies, que parasitam mais de 5.500 espécies de plantas (GOODEY; FRANKLIN; HOOPER, 1965; CASTAGNONE-SERENO; DANCHIN, 2014).

O ciclo de vida do nematoide de galhas consiste em seis estágios, ovo, J1, J2, J3, J4 e adultos. Somente o estágio J2 (móvel) é capaz de infectar as raízes do hospedeiro e, os estágios adicionais de desenvolvimento ocorrem nos locais de alimentação (ESCOBAR et al., 2015) envolto pela galha (GOMES, 2020). O J4 muda para adulto fêmea, geralmente os machos deixam a raiz, e as fêmeas tornam-se sedentárias, aumentam seu tamanho e passam a ter forma globosa ou de pêra, e depositam seus ovos fora da raiz em uma matriz gelatinosa de glicoproteína, que serve como proteção contra predadores e dessecação (PERRY; MOENS 2011; ESCOBAR et al., 2015; SIKANDAR et al., 2020). A fêmea produz em torno de 400 ovos, gerando um rápido aumento da população (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Este ciclo dura em média de três a quatro semanas, e depende das condições climáticas, sendo que temperaturas extremas podem reduzir ou paralisar as atividades dos nematoides (FERRAZ; BROWN, 2016) Apesar de sobreviver em condições temperadas, esse parasita se desenvolve melhor em climas tropicais (STRAJNAR et al., 2011; WOLFGANG et al., 2019).

Durante o processo de entrada e estabelecimento do nematoide, ele induz a formação um local de alimentação essencial ao parasitismo, e galhas externamente a raiz, entendida como uma resposta secundária dessa interação (BIRD; KALOSHIAN, 2003). Estas galhas são oriundas da hiperplasia e hipertrofia das células vizinhas ao sítio de infecção/alimentação estabelecido pelas fêmeas (ALVES, 2014). A formação de galhas nas raízes depende da espécie de *Meloidogyne* envolvida, da densidade populacional desse nematoide e da espécie

ou cultivar de planta hospedeira. Normalmente quanto maior a densidade populacional do nematoide, maior será a quantidade de galhas (MITKOWSKI; ABAWI, 2003).

Apesar de ser o sintoma mais característico, não é obrigatório em todas as plantas, e pode variar de tamanho e posição, sendo de bem evidentes a pouco perceptíveis em determinadas espécies (FERRAZ; BROWN, 2016). Essa diferença no tamanho e forma das galhas pode ser notada nas espécies de hortaliças avaliadas no presente trabalho (FIGURA 1). Galhas maiores, por vezes unidas e com formato irregular no quiabeiro (FIGURA 1A), na alface poucas galhas com formato mais esférico (FIGURA 1B), na salsinha uma maior quantidade de galhas pequenas e esféricas (FIGURA 1C), enquanto no jiloeiro muitas galhas unidas e formando um intumescimento nas raízes (FIGURA 1D).

Figura 1 – Diversidade de galhas nas raízes das hortaliças estudadas.

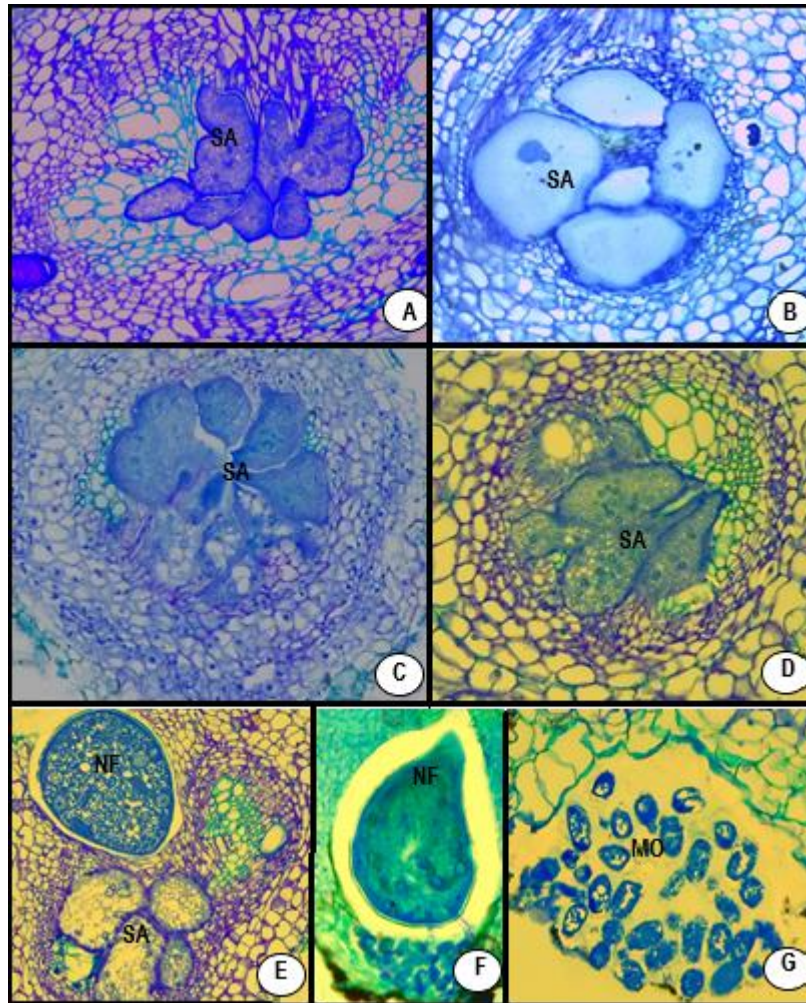


Legenda: A-D: Galhas nas hortaliças. A – Galhas no quiabeiro aos 66 dias após a inoculação (DAI). B – Galhas na alface aos 50 DAI. C – Galhas na salsinha aos 66 DAI; D – Galhas no jiloeiro aos 72 DAI. Galhas ponta da seta.

Fonte: Do autor, 2022.

Na forma infectante, o juvenil J2 ao penetrar na zona de alongamento da raiz através da secreção de enzimas hidrolíticas (PERRY; MOENS, 2011), atinge o cilindro vascular e forma um grupo de 5 a 8 células de alimentação (ESCOBAR et al., 2015). Estas células são formadas por hipertrofia e sucessivas divisões dos núcleos sem completar a citocinese (NIÑOCASTAÑEDA, 2015). As células gigantes formam o sítio de alimentação dos nematoides (FIGURA 2A, B, C, D e E), apresentam características peculiares com grande quantidade de núcleos, paredes espessas, citoplasma denso e, às vezes, granuloso (ASMUS; FERRAZ; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2000).

Figura 2 – Alteração na estrutura anatômica das raízes das hortaliças inoculadas com *Meloidogyne* spp.



Legenda: A-E: Sítios de alimentação formado por células gigantes. A – Sítio de alimentação no quiabeiro aos 18 dias após a inoculação (DAI); B – Sítio de alimentação na alface aos 27 DAI; C – Sítio de alimentação na salsinha aos 25 DAI; D – Sítio de alimentação no jiloeiro aos 25 DAI. E – Sítio de alimentação e a fêmea do nematoide aos 32 DAI na raiz do jiloeiro; F – Fêmea do nematoide e massa de ovos. G – Massa de ovos em detalhes.

SA = Sítio de alimentação; NF = Nematode fêmea; MO = Massa de ovos.

Fonte: Do autor, 2022.

Estas células nutridoras são metabolicamente ativas, funcionam como células de transferência, de onde o nematoide (FIGURA 2E, F) retira os nutrientes dos tecidos condutores (MIEIDANI et al., 2019), sendo a única fonte de nutrientes durante seu ciclo de vida. As células gigantes são a chave de um parasitismo bem-sucedido (DAVIS; HUSSEY; BAUM, 2004), e o ciclo se encerra com a deposição da massa de ovos (FIGURA 2G).

Assim, conhecer o desenvolvimento das galhas e o exato momento de formação destas células gigantes durante o processo de infecção pode se tornar peça-chave para futuros estudos para engenharia genética e seleção de cultivares resistentes. O estudo das células

gigantes também tem sido reportado em diversos trabalhos com intuito de auxiliar no entendimento das alterações do sistema radicular das hospedeiras e entender danos causados em culturas susceptíveis. Nas culturas analisadas foram observados sítios de alimentação bem formados, capazes de suportar a alimentação do nematoide (FIGURA 2A, B, C, D e E) e impactar toda estrutura anatômica das raízes.

2.3 Estrutura da parede celular e suas alterações em resposta a infecção por nematoides

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica, com papel essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal (SRIVASTAVA et al., 2017), auxiliando no suporte e resistência à pressão de turgescência interna, proteção contra patógenos, desidratação, sinalização, armazenamento de carboidratos e controle da taxa e direção de crescimento (ALBERSHEIM et al., 2011). Ela é composta de microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas solúveis (STICKLEN, 2008).

As hemiceluloses são formadas por um grupo heterogêneo de polissacarídeos que se ligam com firmeza à parede (TAIZ; ZEIGER, 2004), sendo o xiloglucano (HAYASHI; KAIDA, 2011) e arabinoxilano (CARPITA; GIBEAUT, 1993) as principais encontradas em eudicotiledôneas e monocotiledôneas comelinóides. As hemiceluloses podem ser diferentes em órgãos jovens, com maior taxa de crescimento, em relação a tecidos maduros, sem expansão celular na qual auxiliam na defesa contra patógenos (WOLF; HÉMATY; HÖFTE, 2012).

As pectinas são um grupo de polissacarídeos estruturais da parede celular que participam do crescimento e desenvolvimento vegetal (SEYFRIED et al., 2016). São complexas e heterogêneas, ricas em α -galacturonato constituídas principalmente de três domínios interligados entre si por ligações glicosídicas: homogalacturonano, ramnogalacturonano-I (RG-I) e ramnogalacturonano-II (RG-II) (O'NEILL; ALBERSHEIN; DARVILL, 1990; FRY, 2010).

São consideradas o principal cimentante da parede celular, que auxilia na firmeza, coesividade do tecido, resistência mecânica (ZHONGDONG et al., 2006) expansão, adesão, sinalização intercelular (HOUSTON et al., 2016) e ainda na regulação a porosidade (WOLF; GREINER, 2012). A sua distribuição e o grau de esterificação são variáveis envolvidas nas mudanças estruturais e funcionais da parede celular (SANTANA, 2014), sendo que a rápida expansão do tecido e das células causa variação no grau de metil-esterificação das pectinas (FORMIGA et al., 2013; CARNEIRO; OLIVEIRA; ISAIAS, 2014; DHEILLY et al., 2016).

A parede celular tem sua forma, composição e propriedades alteradas no decorrer da vida celular em resposta ao crescimento (PEAUCELLE; BRAYBROOK; HÖFTE, 2012), diferenciação (ODA; FUKUDA, 2011), estresses e agentes abióticos (KONNO; NAKATO; TSUMUKI, 2003; ALBERSHEIM et al., 2010) e bióticos (BISHOP et al., 2002; HAMANN, 2012).

Tem sido relatadas alterações na estrutura da parede celular durante a formação de galhas induzidas por insetos (FORMIGA et al., 2013; MARTINI, 2017) e por nematoides (MEIDANI et al., 2019; VILELA et al., 2021). Com a entrada do nematoide de galhas os mecanismos de defesa são ativados (HOLBEIN; GRUNDLER; SIDDIQUE, 2016) e a parede celular desempenha um papel importante nesse processo (VERONICO et al., 2018).

Os nematoides modificam a função das células e a composição da parede celular (BOZBUGA et al., 2018). Na formação do sítio de alimentação deste microrganismo ocorre a rediferenciação de algumas células. As células gigantes atingem seu tamanho máximo em duas semanas, e sua expansão está relacionada ao aumento do volume do citoplasma, das organelas e da espessura da parede celular (CAILLAUD et al., 2008). Mudanças na forma e volume dessas células podem ser devido ao aumento de homogalacturonanos que auxiliariam a manter a flexibilidade, como já foi observado na parede de células guardas (GIANNOUTSOU; GALATIS; APOSTOLAKOS, 2019). A composição da parede celular de células gigantes induzidas por *M. incognita* foi estudada em *Arabidopsis thaliana*, Feijão azuqui (*Vigna angularis*) e milho (*Zea mays*), sendo observadas diferenças na detecção de polissacarídeos nos diferentes hospedeiros (BOZBUGA et al., 2018).

Neste contexto, os estudos imunocitoquímicos são ferramentas importantes para se conhecer a dinâmica dos polímeros que formam a parede celular, especialmente por mostrar a localização espacial e temporal dos epítomos que são sítios específicos dos diferentes constituintes da parede celular (DOLAN; LINSTED; ROBERTS, 1995; KNOX, 2006). O estudo da parede celular é desafiador devido a sua heterogeneidade e complexidade estrutural (PATTATHIL et al., 2015), porém pode fornecer informações importantes para a cascata de eventos que ocorrem na formação das células gigantes e assim permitir a infecção do nematoide das galhas em raízes de diferentes cultivares.

3 PERSPECTIVAS

Este estudo foi realizado com objetivo de contribuir com o conhecimento da interação nematoide/planta. O gênero de nematoide escolhido *Meloidogyne* spp. é o mais importante devido a sua distribuição e agressividade, causando grandes perdas de produtividade nas culturas. Dessa forma, informações que possam mostrar como esse parasita impacta no desenvolvimento das culturas são necessárias, pois os danos variam de acordo com a espécie de *Meloidogyne* envolvida e espécie de planta hospedeira.

Após a contaminação da área com esse parasita, dificilmente ele será eliminado, e as medidas utilizadas são para minimizar o efeito nas culturas. Nesse aspecto tem se destacado produtos de controle biológico, visto que o uso de nematicidas químicos tem sido cada vez mais questionado. Esses produtos têm grande potencial para mitigar os danos nas culturas, principalmente em hortaliças, e o sucesso da sua utilização depende de estudos como este, das interações entre planta, nematoides e o microorganismos presente no produto.

Diante da possibilidade do parasitismo do nematoide limitar a translocação de água e nutrientes, e afetar o desenvolvimento das culturas, estudos histopatológicos podem fornecer informações relevantes acerca da formação do sítio de alimentação e alterações nas áreas adjacentes com a formação das galhas, já que impactam severamente a anatomia das raízes hospedeiras. Enfim este trabalho traz novas perspectivas para estudos mais aprofundados de componentes da parede celular e seu papel na formação de células gigantes, essenciais no parasitismo de *Meloidogyne*, e aliados a estudos dos genes envolvidos nesse processo podem trazer informações relevantes para resistência das espécies, que é um aspecto importante quando se trata de nematoides parasitas de plantas.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N.; CASTAGNONE-SERENO, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 4, p. 217-224, 2003.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; ROBERTS, K.; SEDEROFF, R.; STAEHELIN, A. **Plant cell walls: From chemistry to biology**. New York: Garland Science, 2010.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; ROBERTS, K.; SEDEROFF, R.; STAEHELIN, A. **Plant Cell Walls: From chemistry to biology**. New York: Garland Science, p. 227-272, 2011.
- ALVES, C. M.; VILELA NETO, J. G.; TOMAZ, M. P. P.; BORGES, G. G.; SANTOS, L. C. Levantamento populacional de fitonematoides em áreas cultivadas com hortaliças no município de Iporá, Goiás. In: Congresso Estadual de Iniciação Científica do IF Goiano, 4., 2015, Ceres. **Anais [...]**. Ceres: IF Goiano, 2015. p. 1-2.
- ALVES, G. C. S. **Histologia, bioquímica e herança da resistência do genótipo de algodoeiro TX25 a *Meloidogyne incognita*, raça 3**. 2014. 84 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.
- ANWAR, A. S; McKENRY, M.V; LEGARI, A. U. Host suitability of sixteen vegetable crop genotypes for *Meloidogyne incognita*. **J. Nematol.**, v. 41, p. 64-65. 2009.
- ASMUS, G. L.; FERAZ, L. C. C. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; Alterações anatômicas em raízes de milho (*Zea mays* L.) parasitadas por *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**. v.30, n. 1, p. 33-39. 2000.
- BACETE, L.; MÉLIDA, H.; MIEDES, E.; MOLINA, A. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. **Plant J.**, v. 93, 614-636, 2018.
- BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 36, p. 165-205, 1998.
- BARROS, A. F; CAMPOS, V. P; SOUZA, L. N; COSTA, S. S; TERRA, W. C; LESSA, J. H. L. Morphological, enzymatic, and molecular characterization of root-knot nematodes parasitizing vegetable crops. **Hortic. Bras.**, v. 36, p. 473-479. 2018.
- BIRD, D. M.; KALOSHIAN, I. Are roots special? Nematodes have their say. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 62, p. 115-123, 2003.
- BISHOP, D. L.; CHATTERTON, N. J.; HARRISON, P. A.; HATFIELD, R. D. Changes in carbohydrate coordinated partitioning and cell wall remodeling with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 61, p. 53-63, 2002.
- BOZBUGA, R.; LILLEY, C. J.; KNOX, J. P.; URWIN, P. E. Host-specific signatures of the cell wall changes induced by the plant parasitic nematode, *Meloidogyne incognita*. **Sci Rep.**, v. 8, p.17302, 2018.

- CAILLAUD, M. C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; ABAD, P.; ROSSO, M. N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **J. Plant Physiol.**, v. 165, n. 1, p. 104-113, 2008.
- CARNEIRO R. G. S.; OLIVEIRA D. C.; ISAIAS R. M. S. Developmental anatomy and immunocytochemistry reveal the neo-ontogenesis of the leaf tissues of *Psidium myrtoides* (Myrtaceae) towards the globose galls of *Nothotrioza myrtoidis* (Triozidae). **Plant Cell Rep.**, v. 33, p. 2093-2106, 2014.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, v.3, n. 1, p.1-30, 1993.
- CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. **Heredity**, v. 96, n. 4, p. 282-289, 2006.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G. J. Parasitic success without sex – the nematode experience. **J. Evol. Biol.**, v. 27, p. 1323-1333, 2014.
- CHARCHAR, J. M. *Meloidogyne* em hortaliças. In: Congresso Internacional de Nematologia Tropical; Congresso da Sociedade Brasileira de Nematologia, 19.; Encontro Anual da Organização dos Nematologistas da América Tropical, 27., Rio Quente. **Anais [...]**. Rio Quente: SBN/ONTA, 1995. p. 149-153;
- CHARCHAR, J. M.; MOITA, A.W. Reação de cultivares de alface à infecção por mistura populacional de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em condições de campo. **Hortic. Bras.**, v. 14, n. 2, p. 185-189, 1996.
- CHINELATO, G. **Como controlar o nematoide das galhas de uma vez por todas**. 2019. Disponível em: <<https://blog.aegro.com.br/nematoide-das-galhas>>. Acesso em: 05 jan. 2022.
- CORDEIRO, M. J. Z.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da Bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. p. 99-117.
- DAVIS, E. L.; HUSSEY R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004.
- DHEILLY, E.; GALL, S. L.; GUILLOU, M.; RENOU, J.; BONNIN, E. Cell wall dynamics during apple development and storage involves hemicellulose modifications and related expressed genes. **BMC Plant Biol.**, v. 16, p. 201, 2016.
- DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S. **Nematoídes em soja: Identificação e controle**. Londrina: Embrapa Soja (Circular Técnica 76), 2010.
- DOLAN, L.; LINSTED, P.; ROBERTS, K. An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* root. **Protoplasma**, v. 189, p. 149-155, 1995.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi I**. London: Academic Press, 1980. 264 p.

EAPEN, S. J.; BEENA, B.; RAMANA, K. V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 88, p. 218-225, 2005.

ESCOBAR, C.; BARCALA, M.; CABRERA, J.; FENOLL, C. Overview of root-knot nematodes and giant cells. **Adv. Bot. Res.**, v. 73 p. 1-32, 2015.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. (Orgs.). **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma Editora, 2016.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. v. 1. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011.

FORMIGA, A. T.; OLIVEIRA, D. C.; FERREIRA, B. G.; MAGALHÃES, T. A.; CASTRO, A. C.; FERNANDES, G. W.; ISAIAS, R. M. S. The role of pectic composition of cell walls in the determination of the new shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). **Protoplasma**, v. 250, n. 4, p. 899-908, 2013.

FRAGOSO, R. R.; LOURENÇO, I. T.; VIANA, A. A. B.; SOUZA, D. S. L.; ANDRADE, R. U.; MEHTA, A.; BRASILEIRO, A. C. M.; PINTO, E. R. C.; LIMA, L. M.; ROCHA, T. L.; SÁ, M. F. G. **Interação molecular planta nematoide**. Planaltino: Embrapa Cerrados, 2007.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução a Nematologia**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 84 p.

FRY, S. C. Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. In: ULVSKOV, P. (Ed.). **Annual Plant Reviews: Plant Polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. v. 41, p. 1-42.

GIANNOUTSOU, E.; GALATIS, B.; APOSTOLAKOS, P. De-Esterified Homogalacturonan Enrichment of the Cell Wall Region Adjoining the Preprophase Cortical Cytoplasmic Zone in Some Protodermal Cell Types of Three Land Plants. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 81, p. 1-14, 2019.

GOETTEL, M. S.; HAJEK, A. E.; SIEGEL, J. P.; EVANS, H. C. Safety of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Eds.). **Fungal as biocontrol agents: problems, progress, and potential**. United Kingdom: CABI Publishing, 2001. p. 347-376.

GOMES, C. B. UZUM Pêssego - Sistema especialista para diagnóstico de doenças, pragas e distúrbios fisiológicos em pessegueiros. **Nematoide-das-galhas (*Meloidogyne spp.*)**, (2020) <https://www.cnpuv.embrapa.br/uzum/pessego/nemgalhas.html> Acesso em: 04 jan. 2022.

GOODEY, J. B.; FRANKLIN, M. T.; HOOPER, D. J. **The nematode parasites of plants catalogued under their hosts**. 3rd ed. Bucks: Commonw. agric. Bureaux, Farnham Royal, 1965. 214 p.

HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. **Front. Plant Sci.**, v. 3, n. 77, p. 1-5, 2012.

HAYASHI, T.; KAIDA, R. Functions of Xyloglucan in Plant Cells. **Mol. Plant**, v. 4, n. 1, p. 17-24, 2011.

HELLER, E.; NEUSCHANK, E.; CALSIN, C. P. M.; SANTOLIN, L. D.; GOMES, C. B. Caracterização bioquímica de espécies dos nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) em tabaco. In: Congresso de Iniciação Científica, 28., 2019, Pelotas. **Anais [...]**. Pelotas: UFPel, 2019.

HJELJORD, L.G.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A. Antagonism of nutrient activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 91, n. 12, p. 1172-1180, 2001.

HOLBEIN, J.; GRUNDLER, F. M. W.; SIDDIQUE, S. Plant basal resistance to nematodes: An update. **J. Exp. Bot.** v. 67, p. 2049-2061, 2016.

HOUSTON, K.; TUCKER, M.R.; CHOWDHURY, J.; SHIRLEY, N.; LITTLE, A. The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. **Front. Plant. Sci.**, v. 7, p. 984, 2016.

JAMMES, F.; LECOMTE, P.; ALMEIDA-ENGLER, J.; BITTON, F.; MARTÍN-MAGNIETTE, M.L.; RENOU, J.P.; ABAD, P.; FAVERY, B. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. **Plant J.**, v. 44, p. 447-458, 2005.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L.; PERRY, R. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KNOX, J. P. Up against the wall: arabinogalactan protein dynamics at cell surfaces. **New Phytol.**, v. 169, p. 443-445, 2006.

KONNO, H.; NAKATO, T.; TSUMUKI, H. Altered matrix polysaccharides in cell walls of pocket galls formed by an aphid on *Distylium racemosum* leaves. **Plant Cell Environ.**, v. 26, p. 1973-1983, 2003.

LEITE, R. R. **Diversidade de *Meloidogyne* spp., caracterização de nova espécie na cultura do arroz e seleção de fontes de resistência múltipla em *Oryza* spp.** 2020. 201 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010. 68 p.

MACÊDO, A. G.; PINHEIRO, J. B.; MENDONÇA, J. L. Avaliação da resistência de acessos de jiloeiro ao nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.). In: Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 6., 2016, Brasília. **Anais [...]**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2016.

MARTINI, V.C. **Gradientes funcionais em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) em *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae): Composição da parede celular e metabólitos.** 2017. (Mestrado em Biologia Vegetal)- Universidade Federal de Uberlândia. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.711>

MEIDANI, C.; NTALLI, N. G.; GIANNOUTSOU, E.; ADAMAKIS, I.-D. S. Cell Wall Modifications in Giant Cells Induced by the Plant Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita* in Wild-Type (Col-0) and the *fra2Arabidopsis thaliana* Katanin Mutant. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 21, p. 5465, 2019.

MITKOWSKI, N. A, ABAWI, G. S. **Nematoide de galhas.**The Plant Health Instructor, EUA, 2003.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. Aplicações de princípios de controle o manejo ecológico de doenças de plantas. **Informe Agropecuário.** v. 22, p. 9-18, 2001.

MUKHTAR, T. M.; TARIQ-KHAN, M.; ASLAM, M. N. Bioefficacy of Trichoderma Species Against Javanese Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica*, in Green Gram. **Gesunde Pflanz.**, v. 73, p. 265-272, 2021.

NIÑO CASTAÑEDA, N. E. **Estudo da interação *Musa acuminata*-*Meloidogyne incognita*.** 2015. 267 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

NUNES, H. T. **Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos.** 2008. 75 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

O'NEILL, M.; ALBERSHEIN, P.; DARVILL, A. The Pectic Polysaccharides of Primary Cell Walls. In: DEY, P. M. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry.** London: Academic Press, 1990. v. 2. p. 415-441.

ODA, Y.; FUKUDA, H. Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 15, n. 1, p. 38-44, 2011.

OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O.; GIORIA, R.; BRAGA, K. R. B. Nematoides. In: BRANDÃO FILHO, J. U. T.; FREITAS, P. S. L.; BERIAN, L. O. S.; GOTO, R. (Orgs.). **Hortaliças-fruto.** Maringá: EDUEM, 2018. p. 315-338.

PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; DALE, B. E.; CHUNDAWAT, S. P. S. Insights into plant cell wall structure, architecture, and integrity using glycome profiling of native and AFEXTM - pre-treated biomass. **J. Exp. Bot.**, v. 66, n. 14, p. 4279-4294, 2015.

PEAUCELLE, A.; BRAYBROOK, S.; HÖFTE, H. Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. **Front. Plant Sci.**, v. 3, p. 121, 2012.

PERRY, R. N.; MOENS, M. Survival of parasitic nematodes outside the host. In: PERRY, R. N.; WHARTON, D. A. (Ed.). **Molecular and physiological basis of nematode survival.** Wallingford: CAB International, 2011. p. 1-27.

- PINHEIRO, J. B. **Nematoides em Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2017.
- PINHEIRO, J. B.; AMARO, G. B.; PEREIRA, R. B. **Ocorrência e controle de nematoides em hortaliças folhosas**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica 89), 2010.
- PINHEIRO, J. B.; FERREIRA A. D.; PEREIRA, R. B. **Ocorrência e manejo de nematoides em apiáceas**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica 103), 2012.
- PINHEIRO, J. B.; MELO, R. A. C.; RAGASSI, C. F. **Manejo de nematoides em hortaliças sob plantio direto**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica 171), 2019.
- PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B. **Manejo de nematoides na cultura do coentro e salsa**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica 149), 2016.
- PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. P.; RODRIGUES, C. S. SUINAGA, F. A. **Manejo de nematoides na cultura de alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica 124), 2013.
- ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reprodução de *Meloidogyne javanica* em olerícolas e em plantas utilizadas na adubação verde. **Trop. plant pathol.**, v. 38, n. 2, p. 133-141, 2013.
- SÁ, M. G. **Análise funcional de genes expressos em glândula esofágica dorsal de *Meloidogyne incognita* envolvidos no fitoparasitismo**. 2011. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.
- SANTANA, A. P. **Galhas do parque estadual serra verde: produção de conhecimento e estratégias de interpretação ambiental**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- SEYFRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.; BOVO, F.; STEVAN-HANCKE, F. R.; MAURER, J. B. B.; ZAWADZKIBAGGIO, S. F. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 18, n. 1, p. 201-214, 2016.
- SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I. HERRERA-ESTRELLA, A. A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, p. 687-693, 2001.
- SIKANDAR, A.; ZHANG, M.; WANG, Y.; XIAOFENG, Z.; LIU, X.; FAN, H.; XUAN, Y.; CHEN, L.; DUAN, Y. *In vitro* evaluation of *Penicillium chrysogenum* against *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). **Sci Rep**, v. 10, p. 8342, 2020.
- SILVA, G. S. Identificação de espécies e raças de *Meloidogyne* associadas a hortaliças no estado do Maranhão. **Nematologia Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 51-58, 1991.
- SILVA, R. V.; GOLYNSKI, A. A.; PAES JUNIOR, R. C.; MILAGRE; B. E. A.; FURTADO, J. P. M. Nematoides das galhas, gênero *Meloidogyne*, em hortaliças no município de Joviânia, região sul do Estado de Goiás. **Hort. bras.**, v. 30, n. 2, 2012.

SILVA, T. B. **Biofumigação associada à solarização no controle de *Meloidogyne incognita* em alface.** 2021. 17 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Instituto Federal Goiano, Urutaí, 2021.

SRIVASTAVA, S.; KUMAR, A.; PANDEY, A.; PANDEY, A. Intensification of hydrogen production by *B. licheniformis* using kitchen waste as substrate. **Int. J. Hydrog. Energy**, v. 42, n. 34, p. 21659-21666, 2017.

STICKLEN, M. B. Plant Genetic Engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nat. Rev. Genet.**, v. 9, p. 433-443, 2008.

STIRLING, G. R. **Biological Control of Plant Parasitic Nematode: Progress, Problems and Prospects.** Wallingford: CAB International, 1991. 282 p.

STRAJNAR, P.; ŠIRCA, S.; KNAPIČ, M.; UREK, G. Effect of Slovenian climatic conditions on the development and survival of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica*. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 129, p. 81-88, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

VAZ, M. V.; CANEDO E. J.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**, v. 8, p. 203-212, 2011.

VERONICO, P.; PACIOLLA, C.; POMAR, F.; LEONARDIS, S.; GARCÍA-ULLOA, A.; MELILLO, M.T. Changes in lignin biosynthesis and monomer composition in response to benzothiadiazole and root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infection in tomato. **J. Plant Physiol.** 230, p. 40-50, 2018.

VILELA, R. M. I. F.; KUSTER, V.C.; MAGALHÃES, T. A.; MORAES C. A.; PAULA FILHO A. C.; OLIVEIRA D. C. Impact of *Meloidogyne incognita* (nematode) infection on root tissues and cell wall composition of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench, Malvaceae). **Protoplasma**, v. 258, p. 979-990, 2021.

VILELA, R. M. I. F.; MARTINI V. C.; GONÇALVES L. D. A.; KUSTER, V. C.; OLIVEIRA D. C. Structure and development of root gall induced by *Meloidogyne javanica* in *Glycine max* L. **Semina**, v. 40, p. 1033-1048, 2019.

VOVLAS, N.; MIFSUD, B.; LANDA, B; CASTILLO, P. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. **Plant Pathol.**, v. 54, n. 5, p. 657-664, 2005.

WOLF, S.; GREINER, S. Growth control by cell wall pectins. **Protoplasma**, v. 249, p. 169-175, 2012.

WOLF, S.; HÉMATY, K.; HÖFTE, H. Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 63, p. 381-407, 2012.

WOLFGANG, A.; TAFFNER, J.; GUIMARÃES, R. A.; COYNE, D.; BERG, G. Novel strategies for soil-borne diseases: exploiting the microbiome and volatile-based mechanisms

toward controlling *Meloidogyne*-based disease complexes. **Front. microbiol.**, v. 10, p. 1296, 2019.

ZHONGDONG, L.; GUOHUA, W.; YUNCHANG, G.; KENNEDY, J. F. Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. **Carbohydr. Polym.**, v. 64, n. 4, p. 548- 552, 2006.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 – IMPACT OF *Meloidogyne incognita* (NEMATODE) INFECTION ON
ROOT TISSUES AND CELL WALL COMPOSITION OF OKRA (*Abelmoschus
esculentus* L. MOENCH, MALVACEAE)**

**(VERSÃO ACEITA PARA PUBLICAÇÃO)
NORMAS DO PERIÓDICO PROTOPLASMA**

Impact of *Meloidogyne incognita* (Nematode) infection on root tissues and cellwall composition of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench, Malvaceae)

Roberta Mendes Isaac Ferreira Vilela, Vinícius Coelho Kuster, Thiago Alves Magalhães, Camila Araújo Moraes, Adelino Cardoso de Paula Filho and Denis Coelho de Oliveira¹

Abstract

Root-knot nematodes are endoparasites whose mature females lodge and grow inside the root of some cultivated plants, leading to losses in productivity. Herein, we investigated if the infection of okra, *Abelmoschus esculentus* (Malvaceae), promoted by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Meloidogynidae) changes some agronomic traits of the host plant, as well as the cell wall composition of the root tissues. The okra Santa Cruz 47[®] cultivar was infected with a suspension of 5.000 *M. incognita* juveniles (J2). The inoculated and non-inoculated okra plants were then submitted to morphological analysis at the end of experiment, as well a histological (at 4, 11, 18, 39 ad 66 days after inoculation) and immunocytochemical analysis (control and 66 days after inoculation). Root-knot nematode infection reduced the dry weight of the stem system but, unexpectedly, the number and weight of fruits increased. At 11 days after inoculation, we detected the presence of giant cells that increased in number and size until the end of the experiment, at 66 days after inoculation. These cells came from the xylem parenchyma and showed intense and moderate labeling for epitopes recognized by JIM5 and JIM7. The presence of homogalacturonans (HGs) with different degrees of methyl esterification seems to be related to the injuries caused by the nematode feeding activity and to the processes of giant cell hypertrophy. In addition, the presence of HGs with high methyl-esterified groups can increase the cell wall porosity and facilitate the flux of nutrients for the root-knot nematode.

Keywords: Cultivated plants. Giant cells. Pectin. Root-knot nematode.

¹VILELA, R. M. I. F.; KUSTER, V.C.; MAGALHÃES, T. A.; MORAES C. A.; PAULA FILHO A. C.; OLIVEIRA D. C. Impact of *Meloidogyne incognita* (nematode) infection on root tissues and cell wall composition of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench, Malvaceae). **Protoplasma**, v. 258, p. 979-990, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01618-0>.

1 Introduction

The root-knot nematode is one of the most relevant pathogens of cultivated plants around the world, affecting different cultures and leading to great losses in productivity (Jones et al. 2013; Silva et al. 2016). The genus *Meloidogyne* (Meloidogynidae) stands out as the main disease-causing agent for okra, *Abelmoschus esculentus* L. Moench (Malvaceae) (Pinheiro et al. 2013), leading to a loss of up to 27% in productivity (Sikora and Fernandez 2005). Okra is highly suitable for small farm agriculture (Filgueira 2008) since it involves low production costs, easy growth, and highly profitable revenue (Mota et al. 2000). It is also a versatile and nutrient-rich vegetable of great potential value, which may be used for its oil, fuel and biomass, and as animal feed (Martin 1982). Despite many benefits, okra culture is exceptionally susceptible to attack by nematodes, such as *Meloidogyne incognita* root-knot nematode, that could impact the productivity of the crop.

Root-knot nematodes are endoparasites whose globose and sedentary mature females lodge and grow inside the root of plants (Mitkowski and Abawi 2003). These nematodes feed on the stele cells of roots, inducing galls by cell division and hypertrophy of the root cortex (Williamson and Gleason 2003; Galbieri and Belot 2016). During the feeding activity of the root-knot nematodes, 5 to 8 feeding cells, the giant cells, develop in the vascular cylinder (Escobar et al. 2015). Giant cells are induced by the effector proteins secreted by the nematode, which interact with genes and proteins of the host cells (Bellafiore 2010; Gheysen and Mitchum 2011; Ali et al. 2017), change their physiological and structural traits (Siddique et al. 2015; Juvale and Baum 2018; Smant et al. 2018), and lead to the success of the parasitism. Giant cell formation depends on the continuous feeding stimulus of the gall-inducing nematode, starting with successive nuclear divisions without cytoplasmic division (Mitkowski and Abawi 2003; Abad et al. 2009; Escobar et al. 2015), which makes the cells multinucleated. During giant cell development, the cell cytoplasm turns dense and the cell wall invaginates, increasing the cell surface and the absorption of photoassimilates, minerals, and other substances (Reddigari et al. 1985; Berg et al. 2009; Vilela et al. 2019). For instance, the giant cells induced by the root-knot nematode on *Glycine max* L. exhibited invaginations on their walls and numerous associated mitochondria (Vilela et al. 2019). The occurrence of numerous mitochondria in giant cells indicates a high energy demand (Golinowvsky et al. 1996; Hussey and Grundler 1998; Vieira et al. 2013) since giant cells are a specialized sink, supplying resources to the nematode until reproduction.

Few studies using a cellular approach have addressed the changes in cell wall composition promoted by infectious nematodes in host plants. As examples, distinct syncytial cell wall compositions were recorded in infectious processes induced by *Heterodera shachtii* in *Arabidopsis thaliana*, by *Globodera pallida* in potatoes, by *Heterodera glycines* in soybean and by *H. avenae* and *H. filipjevi* in spring wheat (Davies et al. 2012; Zhang et al. 2016). In the present study, we focused on how the infection by root-knot nematodes changes one of the most important components of the primary cell wall, i.e., pectic polysaccharide (see Albersheim et al. 2011). The main pectic polysaccharides are homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG-I), rhamnogalacturonan-II (RG-II), xylogalacturonan (XGA), and apiogalacturonan (AP) (Ridley et al. 2001; Willats et al. 2001; Albersheim et al. 2011). Changes in cross-linking capacity with cations and the degree of methyl-esterification of these polysaccharides, especially HGs, can define the physical and biological properties of the cell walls (Willats et al. 2020; Albersheim et al. 2011; Liu et al. 2013; Oliveira et al. 2014; Martini et al. 2019). The dynamics and impact of *M. incognita* on the host cell wall composition of the host have not been addressed yet. Thus, understanding the cell wall dynamics and composition of giant cells in relation to surrounding cells can provide new insights into the parasite-host interaction and the mechanism of nematode gall formation.

The current study evaluates the tissue and cellular changes promoted by the *M. incognita* root-knot nematode on *A. esculentus*. Cell wall composition was targeted here, with emphasis on protein and pectin modulation during giant cell development, which would help us understand how *M. incognita* respond to the *A. esculentus* infestation. Our objectives were: (i) to assess the influence of *M. incognita* root-knot nematodes on the agricultural traits of the okra plant; to (ii) determine changes in the development, morphology and histology of roots infected by *M. incognita*; and (iii) evaluate the changes of pectin and protein cell wall composition of root-knot nematode galls, with emphasis on giant cell events.

2 Material and methods

2.1 Experimental setup

The experiment was carried out in the greenhouse of Centro Universitário UniCerrado, Goiátuba municipality (18° 00' 45" S, 49° 21' 17" W), Goiás State, Brazil, between February and May 2019. *A. esculentus*, Okra Santa Cruz 47[®] cultivar (Figure 1A), was selected for the experiment since it is the cultivar most extensively used by small cropping farmers in Brazil

(Pinheiro 2017) and because of its high susceptibility to infection with the root-knot nematode *M. incognita* (Oliveira et al. 2007).

Okra seeds were sown into 98-cell trays filled with Bioplant[®] substrate. Two weeks after emergence, seedlings were transplanted to 2.8 L vases with a substrate proportion of 1:1 sand/soil sterilized by autoclaving at 120°C for one hour, along with 12 g of the fertilizer Forth Cote NPK (15-09-12). Six days after transplantation, the root-knot nematodes were inoculated into two holes around the roots by pipetting a 5 ml suspension of 5.000 *M. incognita* juveniles (J2). Just the inoculated juvenile females can induce gall on the roots. A total of 50 okra plants were inoculated and 50 others were kept as controls (i.e. non-inoculated plants) among two treatments with 10 repetitions. Each plot was composed of five vases and each vase contained one plant in a randomized block design.

Figure 1. Morphological characteristics of okra *Abelmoschus esculentus*, Santa Cruz 47[®] cultivar, inoculated with the *Meloidogyne incognita* root-knot nematode.



Legend: **A**-Structure of okra used in the experiments; **B**- Roots with galls (white dotted circle); **C**- Small galls; **D**-Medium galls;**E**- Large galls. Abbreviations: Ga= Gall. Bars= 0.2 cm.

2.2 Structural and agronomical traits of nematode galls

The structural traits resulting from gall infection were analyzed at 4, 11, 18, 39 and 66 days after inoculation (DAI). After evaluating the root changes in each DAI, we selected inoculated ($n = 40$) and non-inoculated ($n = 40$) okra plants at 66 DAI for specific agronomical trait analyses. At these stages, all plants were carefully removed from the vases and placed on paper towels to dry. The height of the stem system (from the collar to the terminal bud of the main axis) and the length of the roots (Figure 1B) were measured. The fresh weight of the stem system, fruits, and roots was weighed on a digital scale (Balmak ELP-10), followed by drying in a kiln for 72 hours and weighing the dry weight.

The fruits were manually counted and weighed using a digital scale (Balmak ELP-10) for the assessment of productivity. Galls were isolated and counted for the estimation of gall index (GI) according to Taylor and Sasser (1978), with plants showing resistant reaction status when they have 0 to 10 galls and susceptible reaction status when they have ≥ 11 galls. The method of Coolen and D'Herde (1972) was used to extract and count the nematodes from 20 roots of okra plants. Galls were classified as large when measuring ≥ 1 cm and as small/medium galls when measuring ≤ 1 cm (Figure 1 C-E).

2.3 Histological features

Samples of inoculated okra roots (i.e. 4, 11, 18, 39 and 66 days after inoculation) and non-inoculated roots (i.e. 4 and 66 days after inoculation) were fixed in 4% paraformaldehyde (Roland and Vian 1991), dehydrated in a graded ethanol series (50, 70, 80, 90, and 95%), and embedded in 2-hydroxyethyl methacrylate Leica[®] Historesin (Leica Instruments, Heidelberg, Germany). Next, all samples were cut into 6 μ m transverse and longitudinal sections with a rotary microtome (YD315, ANCAP, Brazil) and stained with 0.05% toluidine blue, pH 4.7 (O'Brien et al. 1964). The sections were mounted with Entellan[®] and analyzed with a Leica[®] DM50 light microscope coupled to an HD camera.

2.4 Immunocytochemical approach

Roots were selected for immunocytochemistry at 66 days after inoculation and at 66 days after normal non-inoculated growth. The previously described Leica[®] Historesin protocol was used, but without sample staining or mounting. The samples were then

incubated in blocking solution (3% powdered milk solution, Molico® in PBS) for 30 minutes to prevent crosslinking, followed by incubation with primary monoclonal antibodies (JIM 5, JIM 7, LM1, LM5, LM6) at 1:5 dilution in blocking solution for one hour in the dark. The samples were washed with PBS three times of 5 min each and incubated with the secondary anti-rat IgG FITC antibody (Sigma-Aldrich®) in blocking solution (1:100) for two hours in the dark. Samples of inoculated and non-inoculated roots without primary antibodies were used as controls. Finally, the samples were washed in PBS, mounted in glycerin/distilled water (1:1 v/v), and analyzed with a Leica® DM4000 B fluorescence microscope coupled to a Leica® DFC3000 G camera. We also use a DAPI filter (excitation spectrum 385-400 nm) for autofluorescence localization (Chomicki et al 2014; Joca et al 2019) in an overlap function of the microscope software to better showed the results of monoclonal antibodies.

The monoclonal antibodies labeled epitopes for low methyl-esterified HG (JIM 5), high methyl-esterified HG (JIM 7), extensin (LM1), (1→4) β-D-galactan (LM5) and (1→5) α-L-arabinan (LM6). Based on immunocytochemical images, the intensity of the fluorescence reaction was measured in the different tissues using gray scale methodology (Gy = Gray value) and ImageJ version 1.51k software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Fluorescence intensity was measured in triplicate in each tissue and classified into the following three intensity categories: (-) negative (= 0 Gy values); (+) weak (<15 Gy values); (++) moderate (15-30 Gy values), and (+++) intense (>30 Gy values).

2.5 Data analyses

Statistical analyses were performed only for the morphological results. First, all data were tested for normal distribution of errors and homogeneity of variances and then analyzed by one-way ANOVA and the Tukey test at the 5% level of significance. Analyses were performed using the SISVAR software (Ferreira 2010).

3 Results

3.1 Agronomical traits

After 66 days, inoculated plants were taller than non-inoculated plants, although there were no differences in root length or fresh weight of the stem system and roots (Table 1). The dry weight of the stem system was greater for the non-inoculated treatment, while inoculated

plants exhibited larger and more numerous fruits than non-inoculated ones (Table 1). In addition, 66 days after inoculation there was counted 425 small/medium galls and 15 large galls for each gall system, and 169 nematodes per 5 g of roots.

Table 1. Means of morphological data and standard derivation from 40 non-inoculated okra plants *Abelmoschus esculentus*, Santa Cruz 47[®] cultivar, and from 40 okra plants inoculated by *Meloidogyne incognita* root-knot nematodes at 66 days after

Treatments	Morphological data						
	HSS (cm)	RL (cm)	FWSS (g)	FWR (g)	DWSS (g)	NF	WF (g)
Not Inoculated	53 ± 31 ^b	40 ± 8 ^a	53 ± 33 ^a	44 ± 0.18 ^a	32 ± 17 ^a	0.78 ± 1.15 ^b	10 ± 17 ^b
Inoculated	71 ± 25 ^a	37 ± 10 ^a	54 ± 28 ^a	47 ± 0.21 ^a	23 ± 21 ^b	1.22 ± 1.21 ^a	19 ± 24 ^a
CV (%)	14.48	15.36	20.76	14.08	28.57	39.33	42.18

inoculation.

Abbreviations: HAP- Height of stem system; RL- Root length; FWSS- Fresh weight of stem system; FWR- Fresh weight of root; DWSS- Dry weight of stem system; NF- Number of fruits; WF- Weight of fruits; CV - Coefficient of variation.

* Averages followed by the same lowercase letter in the columns do not differ between treatments.

3.2 Gall morphology and development

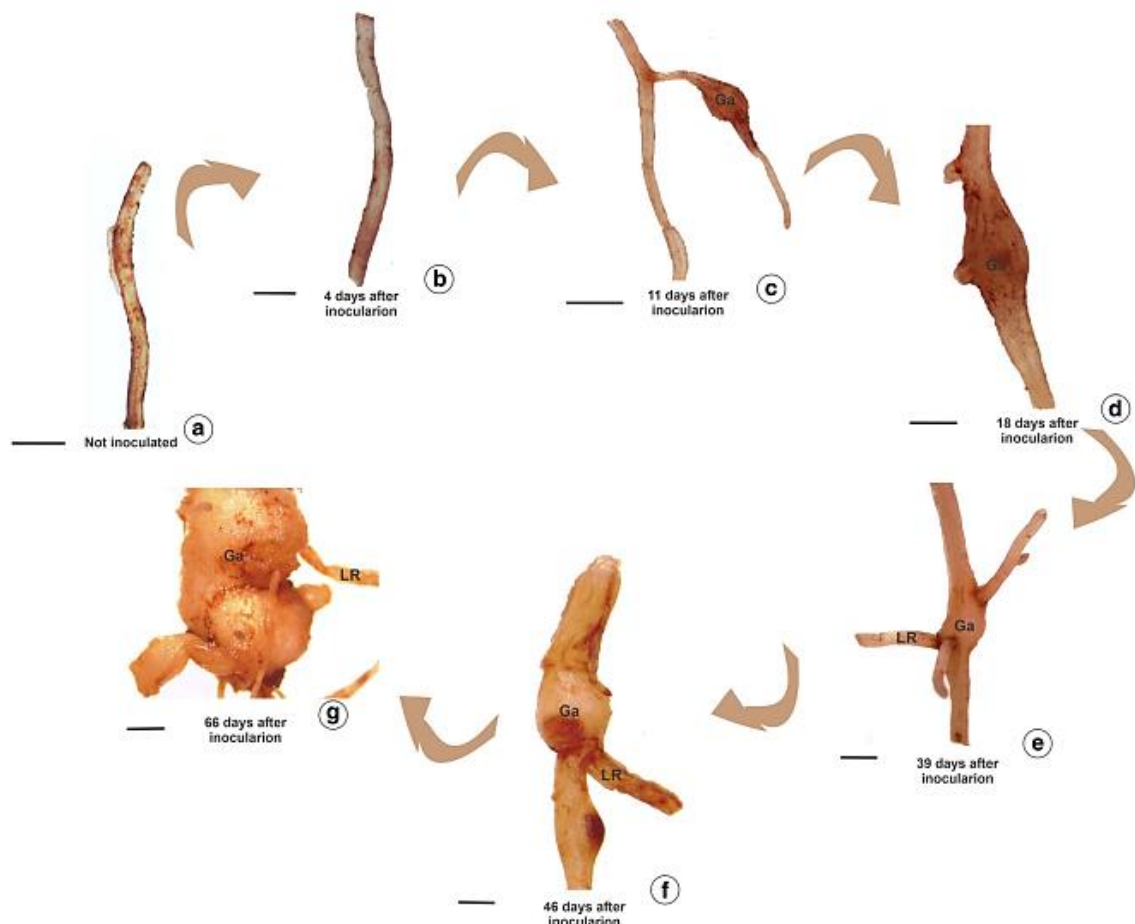
The regular non-inoculated root of *A. esculentus* was light brown in color with small darkened portions and no pronounced protrusions (Fig. 2A). The roots of inoculated plants did not show any noticeable morphological alteration until day 11, when a slight thickening was first detected (Fig. 2B, C). The root-knot nematode galls greatly increased in size after 18, 39, and 46 days (Fig. 2D, E, F), with new lateral roots developing directly from the galls and the principal roots. After 66 days, we noted an increase in gall number on the root system, with these galls being larger, clustered, and of irregular shape. No changes in morphology were noticed in non-inoculated roots except for the regular thickening caused by normal growth (data not shown).

3.3 Histological changes after nematode induction

In general, the gall formation disorganized the histological profile of the roots, creating a new and unique structure. At day 4 of the experiment, the non-inoculated plants of *A. esculentus* showed roots with a uniseriate epidermis, parenchymatic cortex, a vascular cylinder with five protoxylem poles, and no pith (Fig. 3A). On day 66, the vascular cambium

had already been established and secondary growth was usual, with the production of more secondary xylem than secondary phloem (Fig. 3B). The main changes seen in inoculated roots were first detected on day 11, with well-formed multinucleated giant cells produced from xylem parenchymal cells, which changed the typical polyarchy organization of the root (Fig. 3C). After giant cell development, the primary phloem was pushed to the periphery of the gall and the cortex grew due to the hypertrophy process (Fig. 3C). In that stage, a female in contact with the giant cells, which had thick cell walls and dense cytoplasm (Fig. 3C, detail). On day 18, the giant cells remained in the center of the organ, surrounded by primary xylem (Fig. 3D). On day 39, a large amount of secondary xylem was produced, leading to a lateral enlargement of the gall (Fig. 3E). A periderm was produced in outer layers and replaced the epidermis (Fig. 3E). On day 66, new giant cells were produced, with a large increase in the cortical parenchyma through hyperplasia and hypertrophy processes (Fig. 3F, G).

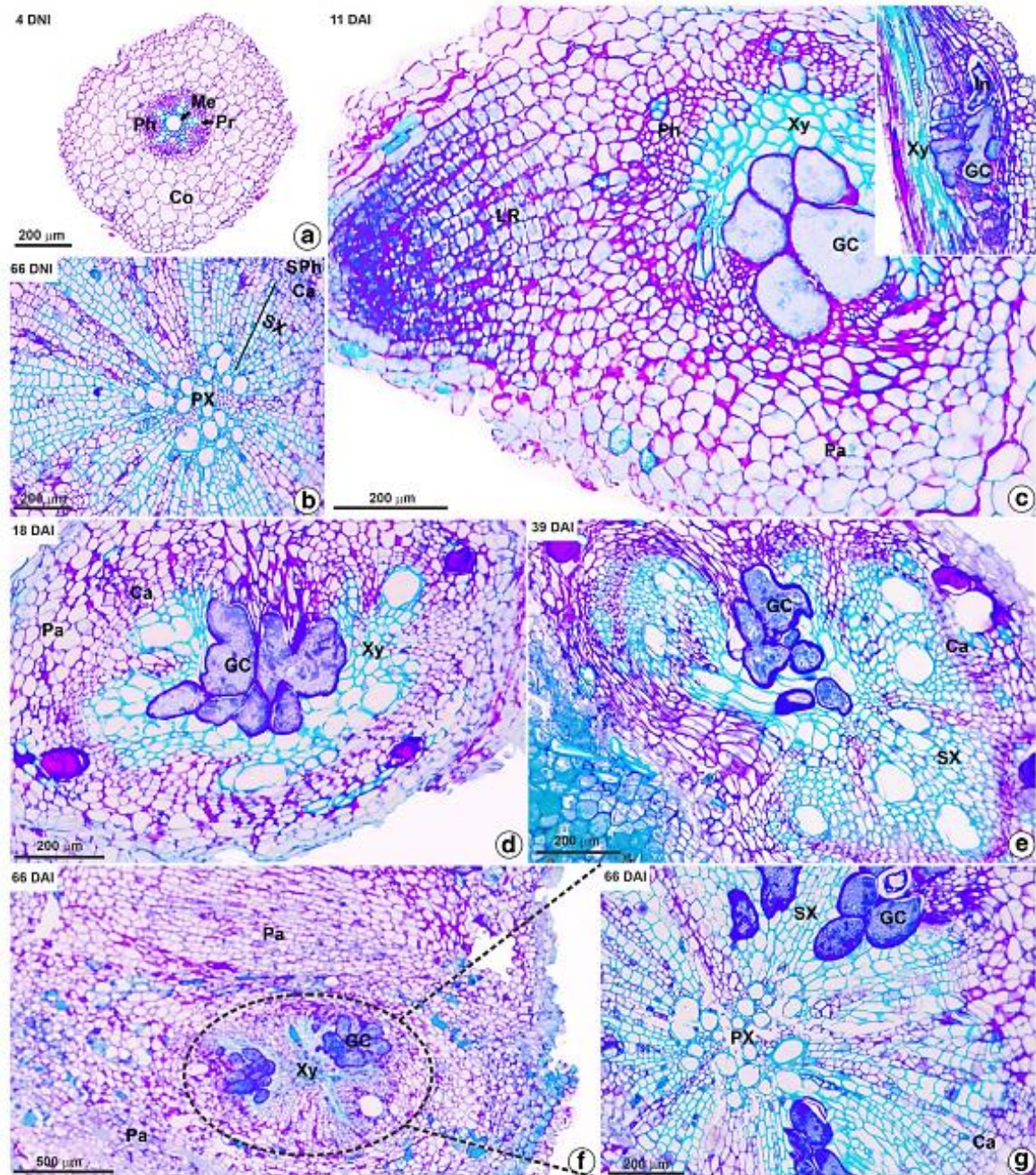
Figure 2. Morphological changes of okra roots *Abelmoschus esculentus*, Santa Cruz 47[®] cultivar, 66 days after inoculation (DAI) of *Meloidogyne incognita* root-knot nematode.



Legend: **A-** Not inoculated root; **B-** 4 DAI, with no morphological signal of galls; **C, D-** After 11 and 18 DAI, respectively, with the beginning of root thickening; **E, F-** Larger and numerous galls at 39

and 46 DAI, respectively; **G**- Well-developed and grouped galls of varied shapes and sizes at 66 DAI. *Abbreviations*: Ga= Galls, LR= Lateral root.

Figure 3. Histological features of okra roots *Abelmoschus esculentus*, Santa Cruz 47[®] cultivar, 66 days after non-inoculated treatment (DNI) and after different days of inoculation (DAI) with *Meloidogyne incognita* root-knot nematodes.



Legend: **A, B**- Non-inoculated roots; **C-G**- Inoculated roots; **A**- 4 DNI with primary axial root and pentarca organization; **B**- 66 DNI with usual secondary growth; **C**- 11 DAI in primary growth and giant cells in formation. In detail, note the presence of the female nematode in touch with the giant cells; **D, E**- 18 and 39 DAI with installation of the vascular cambium and the beginning of secondary growth; **F**- 66 DAI with larger numbers of giant cells and expanded cortical parenchyma. *Abbreviations*: Ca= Vascular cambium, GC = Giant cell, Ph= Phloem, In- Inductor, Me- Metaxylem, Pr- Protoxylem, Co- Cortical parenchyma, SPh- Secondary phloem, SX- Secondary xylem, PX- Primary xylem, Pa- Parenchyma, Xy- Xylem.

3.4 Immunocytochemical analyses

The inoculated and non-inoculated *A. esculentus* roots showed similar results in immunocytochemical analysis (Table 2), which was based on the means and standard deviation present in the supplementary table. However, epitopes of (1→5) α -L-arabinans, recognized by LM6, occurred only in non-inoculated roots (Table 2). These epitopes were intensely labeled in the cortical parenchyma cell walls and moderately in the parenchymal cell wall of xylem, phloem, and vascular cambium (Table 2; Fig. 4A, B). The epitopes of extensin and (1→4) β -D-galactan, recognized by LM1 and LM5, respectively, were not detected in either treatment (Table 2). Epitopes of HGs with high methyl-esterified groups, recognized by JIM7, were intensely to moderately labeled in the cortical parenchyma cell walls and parenchyma cell walls of xylem in both treatments, as well as in giant cells (Table 2; Fig. 4C, D; Fig. 5A, B). Epitopes of HGs with low methyl-esterified groups, recognized by JIM5, were distributed at the same sites as those detected by JIM7, with differences in intensity (Table 2). Epitopes recognized by JIM5 were intensely labeled in the cortical parenchyma cell wall of the non-inoculated root (Table 2; Fig. 4E, F) and moderadamente marcados in the parenchyma cell wall of xylem and giant cells of inoculated roots (Table 2; Fig. 5C, D).

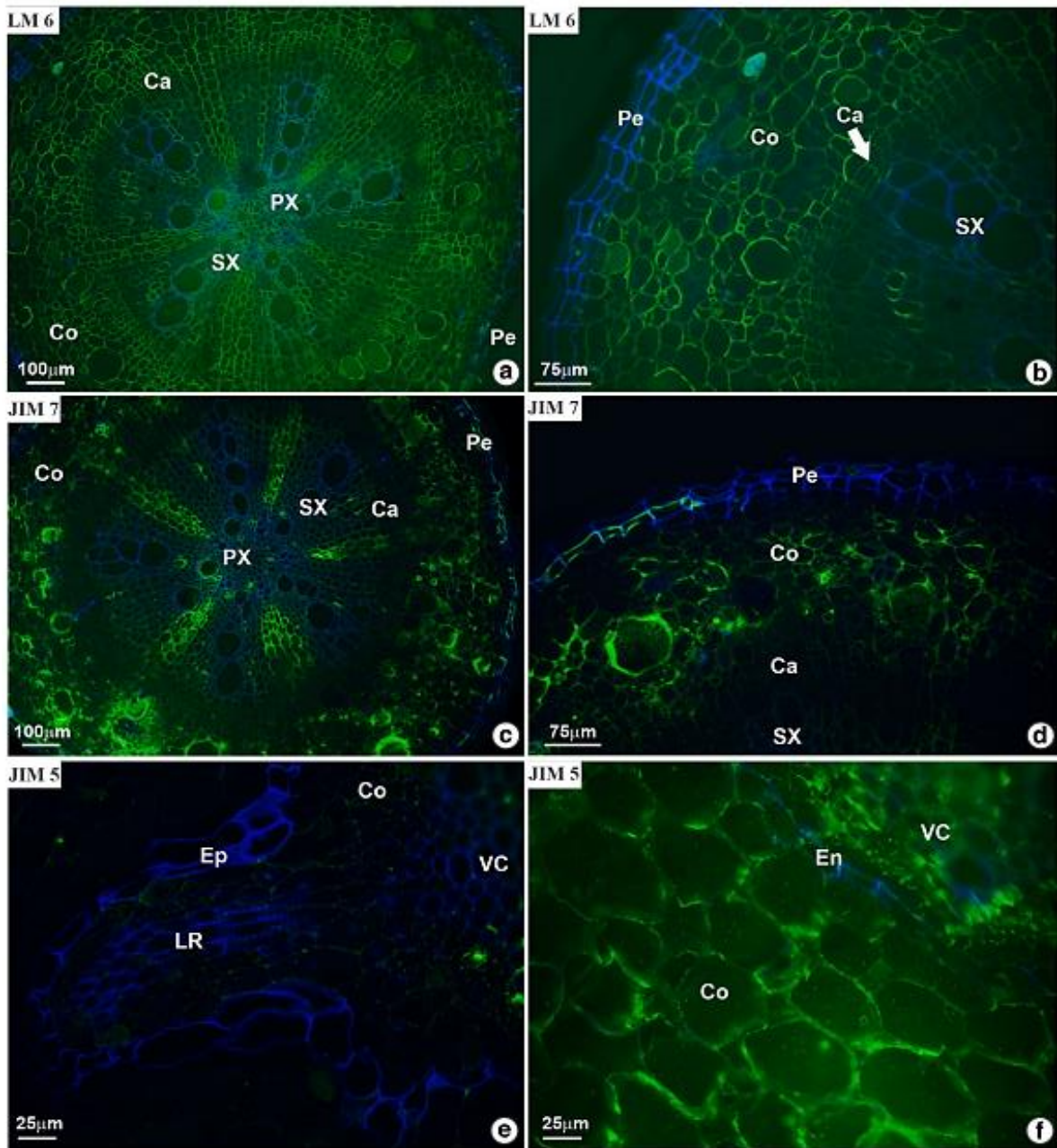
Table 2. Reaction intensity of the epitopes for pectins and proteins of okra root *Abelmoschus esculentus*, Santa Cruz 47[®] cultivar, sat 66 days after inoculation with by *Meloidogyne incognita* root-knotnematodes (DAI) or no inoculation (DNI).

Monoclonal Antibodies	Fluorescence intensity												
	Non-inoculated root						Inoculated root						
	Pe	Co	Xy	Ph	VC	GC	Pe	Co	Xy	Ph	VC	GC	
		PC	VE					PC	VE				
JIM 5	-	+++	+	-	++	+	-	++	+++	-	+	+	+++
JIM 7	-	+++	+++	-	+	+	-	++	+++	-	+	+	++
LM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LM5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LM6	-	+++	++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: Pe- Periderm; Co- Cortical parenchyma; Xy- Xylem; PC- Parenchymal cell of xylem; VE- Vessel element; Ph- Phloem; VC- Vascular cambium; GC- Giant cell.

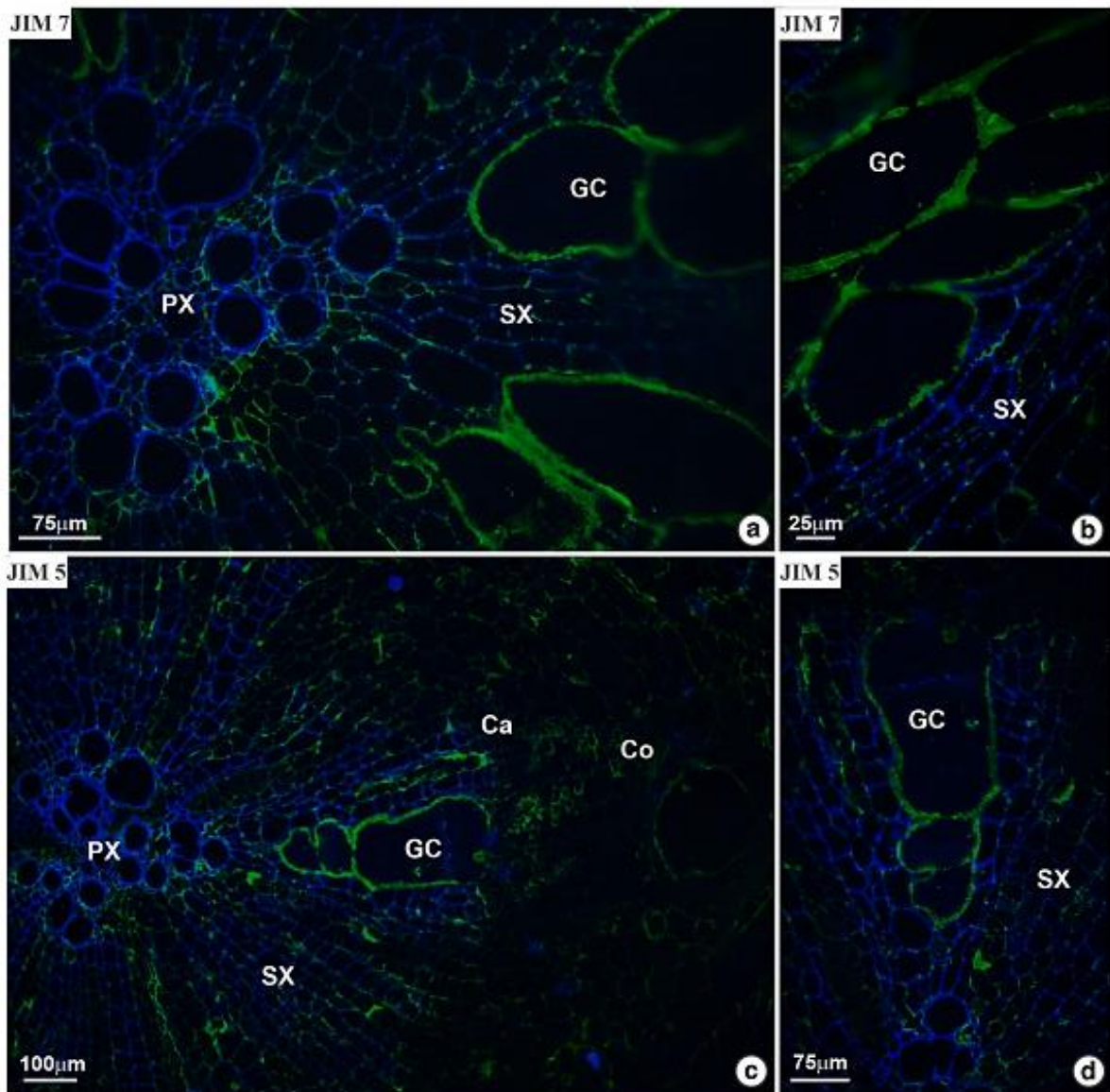
* Intensity of reaction: (-) Negative (= 0 Gy value); (+) Weak (<15 Gy value); (++) Moderate (15_30 Gy value); (+++) Intense (>30 Gy value).

Figure 4. Immunocytochemistry for LM6 (A, B), JIM7 (C, D) and JIM5 (E, F) antibodies in okra roots *Abelmoschus esculentus*, Santa Cruz 47[®] cultivar, at 66 days after non-inoculated treatment (DNI).



Abbreviations: Ca= Vascular cambium, PX- Primary xylem, SX- Secondary xylem, Co- Cortical parenchyma, Pe- Periderm, Ep- Epidermis, LR- Lateral root, En- Endodermis. VC.: Green labeling on the cell wall indicates a positive result, while blue labeling shows autofluorescence using the DAPI filter.

Figure 5. Immunocytochemistry for JIM7 (A, B) and JIM5 (C, D) antibodies for okra roots *Abelmoschus esculentus*, Santa Cruz 47[®] cultivar, at 66 days after inoculation (DAI) with *Meloidogyne incognita* root-knotnematodes.



Abbreviations: Ca= Vascular cambium, PX- Primary xylem, SX- Secondary xylem, Co- Cortical parenchyma, GC- Giant cell. PS.: Green labeling on the cell wall indicates a positive result, while blue labeling shows negative results using the DAPI filter.

4 Discussion

The root-knot nematode *M. incognita* impacts some agronomic traits of okra, decreasing, for example, the dry weight of the stem system. However, some traits such as the number and weight of fruits increased unexpectedly, with these changes possibly being related to an increase in the production of lateral roots stimulated by the presence of galls. Giant cells developed from day 11 after inoculation and increased in number and size until 66 days after inoculation. Giant cells came from the parenchyma cells of xylem and showed

intense and moderate labeling for epitopes recognized by JIM5 and JIM7. The presence of these HGs with different degrees of methyl esterification seems to be related to the injuries caused by the nematode feeding activity, as well as to the typical hypertrophy process that occurs in giant cells (see Vilela et al. 2019).

4.1 Nematode infection determines agronomic traits

Okra is a semi-woody annual shrub that can reach 3 m in height; however, the Santa Cruz 47[®] cultivar is shorter, reaching up to 2 m on average, a height that facilitates harvest (Filgueira 2008). In the present study, okra ranged from 50 to 70 cm in height at harvesting, with a difference between treatments. Unexpectedly, inoculated plants were taller than non-inoculated ones, a result probably due to the moderate stress caused by the nematodes, as already described in the literature (Abrão and Mazzafera 2001). Nevertheless, the nematode-infected plants usually showed a weaker and shorter development of stem systems (Silva et al. 2006). *Meloidogyne* spp. infection can lead to root cortex detachment, interruption of root-tip growth, and extensive mutilation of the root system (Brass et al. 2008), something not detected until 66 days after inoculation in our study.

Fresh root weight did not differ between the non-inoculated and inoculated groups, as also observed in parasitic infection promoted by *M. javanica* in *Tectona grandis* Linn. F. (Oliveira and Silva 2013) and in *Musa* spp. (Cofcewicz 2004). Due to the large number of galls in the inoculated roots in our study, a greater weight of these roots was expected since, according to Carneiro et al. (1999), the formation of galls and the increase in the number and proliferation of lateral roots can lead to an increase in the weight of inoculated plants. For instance, an increase in the fresh weight of the inoculated roots was reported for passion fruit (Sharma et al. 2005). *Meloidogyne* spp. infection also typically reduces plant growth and fruit production (Ritzinger and Ritzinger 2003), although in our study the inoculated plants, surprisingly, produced more and heavier fruits than non-inoculated plants despite a decrease in the dry weight of the stem system. According to Pinheiro et al. (2013), nematode-caused stress may directly or indirectly influence the performance and survival of okra plants, a fact that was also observed here with *M. incognita* infection of okra.

Okra cultivars are highly prone to root-knot nematode infections and are even used to indicate the presence of *Meloidogyne* spp. (Pinheiro et al. 2013). This expected susceptibility was detected and detailed in the current study. We found over 400 galls per root, including small, medium, and large ones, which, according to the gall index (GI) proposed by Taylor

and Sasser (1978), far exceeded the minimum number of 100 for a plant to be considered susceptible. The giant cells are essential for the development of the root-knot nematode, since the nematodes penetrate and establish a feeding site in the root system of plants, thus using their nutrients as food (Kindt 2013). Galls seem to be good indicators of the presence of the parasite (Davis et al. 2004), with the number of galls in a root permitting the host plant to be classified as susceptible or resistant. Herein, we detected a large number of nematodes in roots and, although the literature suggests that the development and productivity of plants could be affected by the infection, this was observed for okra infection with *M. incognita*, but, unexpectedly, sometimes in a positive way.

4.2 Root-knot gall morphology and histopathology

The root-knot nematode induces a root thickening in okra that may be hard to notice before 11 days of inoculation. On the other hand, the gall reaches its maximum size on day 66 after in-oculation. Thus, gall formation is the best-known symptom of *Meloidogyne* nematode infection since galls develop just after the juveniles infect the roots (Mitkowski and Abawi 2003). According to these authors, galls have an elongated shape and a swollen appearance and occur throughout the root system, as was the case for the galls observed in our study. These galls are a result of cell hypertrophy of the cortex or of adjacent cells surrounding the nematode, as well as tissue hyperplasia usually of the pericycle (Vilela et al. 2019). The development of root-knot nematode galls may be the consequence of secretions from esophageal glands injected by the buccal stylet of the nematode, resulting in the formation of giant cells and of galls. The two structure formations are independent of each other (Ferraz and Brown 2016) and, sometimes, galls may be small or indistinct (Moens et al. 2009) or may be absent (Davis et al. 2004; Ferraz and Monteiro 2011).

Here in, we first noted the formation of a feeding site with giant cells on day 11 after inoculation, differently from the findings of Vilela et al. (2019), who noticed giant cells induced on soybean by *M. javanica* on day 18 after inoculation. Also, root-knot galls induced by *M. graminicola* and *M. incognita* on rice (*Oryza sativa* L.) showed different times of giant cell formation, which developed 2 and 6 days, respectively, after inoculation (Nguyên et al. 2014). Giant cells are essential for the development and reproduction of the parasite since they act as a metabolic drain of the plant, taking nutrients from the host plant organs to feed the nematodes (Galbieri and Belot 2016). These worms do not kill host cells (Abad et al. 2003), but rather form a feeding tube (Davis et al. 2004) from the secretions of the esophageal

glands towards the cytoplasm of the plant cell, filtering the cytosol during ingestion (Mitkowski and Abawi 2003). Giant cells typically have a dense cytoplasm, numerous nuclei, and thick cell walls, as observed by Castañeda (2015) in an investigation of banana roots (*Musa acuminata* subgroup Cavendish, cv. Grande Naine) infested with *M. incognita*. Using electron microscopy to study *Glycine max* root galls induced by *M. javanica*, Vilela et al. (2019) revealed that the walls of giant cells were thicker and exhibited invaginations towards the cell lumen. The cell walls undergo thickening and loosening processes to expand and support the absorption of nutrients by the nematodes (Escobar et al. 2005; Bohlmann and Sobczak 2014). The presence of giant cells at 11 days after okra inoculation with *M. incognita* disorganized the central vascular cylinder of the roots and could compromise water transport and nutrient uptake, leading to plant wilt, yellowing, and reduced growth (Dorhout et al. 1991; Anwar and Javed 2010; Premachandra and Gowen 2015). Herein, based on agronomic traits, the growth of the okra plants was not compromised even though giant cells and gall formation disorganized the histological profile of the roots.

4.3 Cell wall composition of parenchyma cells of xylem and giant cells

In general, galls develop from tissue hyperplasia and cellular hypertrophy (Oliveira et al. 2016), and these processes are dependent on changes in cell wall dynamics and composition, as discussed for insect galls (Oliveira et al. 2014; Carneiro et al. 2015; Teixeira et al. 2018; Martini et al. 2019). The development of root-knot nematode galls also requires a sequence of destructive and constructive cell wall modifications (Bohlmann and Sobczak 2014), especially driven by the action of different pectolytic enzymes (see Wiczorek 2015). The detection of pectic epitopes by monoclonal antibodies has been used as a tool to detect pectolytic activities in gall tissues (Oliveira et al. 2014). Herein, cell hypertrophy was a striking feature of the root cortex, leading to gall formation on okra induced by *M. incognita*. Giant cell development also requires changes in the distribution and dynamics of epitopes of high and low methyl-esterified HGs.

HGs with high methyl-esterified groups were intensely detected in the parenchyma cells of xylem in both non-inoculated and inoculated plants. Giant cells showed moderate labeling for HG epitopes with a high degree of methyl-esterification since these cells come from the parenchyma cells of xylem. HGs are linear homopolymers with approximately 100 molecules of (1-4)- α -linked-D-galacturonic acid, synthesized in the Golgi apparatus in a high methyl-esterified form (Albersheim et al. 2011). The presence of HGs with high methyl-

esterified groups is usually detected on young tissues during the processes of growth and elongation (Knox 1992; Albersheim et al. 2011; Wolf and Greiner 2012) and, in galls, it has been associated with the processes of cell hypertrophy during development (Carneiro et al. 2015; Oliveira et al. 2016; Teixeira et al. 2018; Martini et al. 2019). The presence of epitopes with high methyl-esterified groups in the cell walls of giant cells may guarantee cell growth and elongation and, therefore, the establishment of root-knot nematodes.

HGs with low methyl-esterified groups were weakly detected in the parenchyma cells of xylem in non-inoculated plants and intensely in inoculated ones, and also detected intensely in the giant cells. The process of HG de-methyl-esterification depends on the action of pectin methylesterases (PME) or polygalacturonases (PG) (Willats et al. 2000; Hongo 2012). Since the random de-methyl-esterification of HGs leads to whole cell wall degradation and cell death (Hongo et al. 2012), we suppose that these processes in the root-knot nematode gall on okra occur by the action of PMEs. Our results support an intense process of synthesis and de-methyl-esterification of parenchyma cell walls of xylem and giant cells on the roots of inoculated plants. The de-methyl-esterification process and the presence of low methyl-esterified epitopes of HG in the parenchyma cells of xylem and giant cells may increase cell stiffening and porosity, as already detected in galls induced by insects (Oliveira et al. 2014; Carneiro et al 2015; Martini et al. 2019). Herein, the increase in porosity may have favored the nutrient exchange between host tissues and nematode galls induced by *M. incognita* in okra.

5 Conclusions

The root-knot nematode *M. incognita* induces galls and giant cells on the roots of okra, disorganizing the histological profile of root tissues. However, the disorganization of the anatomical structure of the root did not affect the growth and development of okra until 66 days after inoculation, on the contrary, the inoculated plants even grew larger and had larger and more numerous fruits than the non-inoculated ones. Giant cell formation occurs at 11 days after inoculation and is essential for the establishment of root-knot nematodes. As a feeding site for the root-knot nematode, giant cell formation depends on changes in the degree of HG methyl-esterification of the xylem parenchyma cell wall in order to elongate and in nutrients flux due to increased porosity.

References

- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, and Staehelin A (2011) Plant cell walls. Garland Science, New York. 108 (1): viii–ix. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr128>
- Abad P, Castagnone-Sereno P, Rosso MN, Engler JdA, Favery B (2009) Invasion, feeding and development. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds) In Root-knot nematodes. CABI International Press, Cambridge, pp 163-181.
- Abad P, Favery B, Rosso MN, Castagnone-Sereno P (2003) Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Mol Plant Pathol* 4: 217-224. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00170.x>
- Abrão MM, Mazzafera P (2001) Fitossanidade. Efeitos do nível de inoculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. *Bragantia* 60: 19-26. <https://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052001000100003>
- Ali MA, Azeem FLiH, Bohlmann H (2017) Smart parasitic nematodes use multifaceted strategies to parasitize plants. *Front Plant Sci* 8:1699. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01699>
- Anwar SA, Javed N (2010) *Meloidogyne incognita* infecting Dahlia. *Pakistan J Zool*42: 348-350.
- Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D (2013) Evolving views of pectin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 64: 747-779. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105534>
- Bellaafiore S, Briggs SP (2010) Nematode effectors and plant responses to infection. *Curr Opin Plant Biol* 13: 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.05.006>
- Berg RH, Fester T, Taylor CG (2009) Development of the Root-Knot Nematode Feeding Cell. In: Berg RH, Taylor CG (eds) Cell Biology of Plant Nematode Parasitism. Plant Cell Monographs, vol 15. Springer, Berlin. 15: 115–152. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85215-5_5
- Brass FEB, Veronezze NC, Pacheco E, Bosquê GG (2008) Aspectos biológicos do *Meloidogyne spp.* relevantes à cultura de café. *Revista científica Eletrônica de Agronomia*. Editora FAEF, São Paulo.
- Bohlmann H, Sobczak M (2014) The plant cell wall in the feeding sites of cyst nematodes. *Front Plant Sci* Mar 19: 89. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00089>
- Caillaud MC, Dubreuil G, Quentin M, Perfus-Barbeoch L, Lecomte P, de Almeida Engler J, Abad P, Rosso MN, Favery B (2008) Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J Plant Physiol* 165:104-13. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.007>
- Carneiro RG, Ferraz LCCB, Mazzafera P (1999). Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *J. Nematol* 31: 348–355.

- Carneiro RGS, Pacheco P, Isaias RMS (2015) Could the extended phenotype extend to the cellular and subcellular levels in insect-induced galls? PLoS ONE 10: e0129331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129331>
- Castañeda NEN (2015) Estudo da interação *Musa acuminata*- *Meloidogyne incognita*. Thesis, Universidade de Brasília.
- Chomick, G, Bidel, LPR, Jay-Allemand, C (2014) Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylax lindenii* (Lindl.) Benth. *ex* Rolfe. *Flora* 209: 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.01.001>
- Cofcewicz, ET, Carneiro RMDG, Cordeiro CMT, Quénéhervé P, Faria JJC (2004) Reação de cultivares de bananeira a diferentes espécies de nematóides das galhas. *Nematol. Bras* 28: 11-22.
- Coolen WA, D'Herde CJ (1972) A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agricultural Research Centre, Ghent.
- Davis EL, Hussey RS, Baum TJ (2004) Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends Parasitol* 20: 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.01.005>
- Davies LJ, Lilley CJ, Knox JP, Urwin PE (2012) Syncytia formed by adult female *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis thaliana* roots have a distinct cell wall molecular architecture. *New Phytol* 196: 238–246. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04238.x>
- Dorhout R, Gommers FJ, Kollöffel C (1991) Water transport through tomato roots infected with *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 81: 379-385. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-379>
- Escobar C, Barcala M, Cabrera J, Fenoll C (2015) Plant Nematode interactions - A view on compatible interrelationships. In: Escobar C, Fenoll C (eds) *Advances in Botanical Research*. Elsevier, Oxford, pp1-32.
- Ferraz, LCCB, Monteiro, AR (2011) Nematoides. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. Agronômica Ceres, Piracicaba, pp 277-305.
- Ferraz LCCB, Brown DJF (2016). *Nematologia de plantas: fundamentos e importância*. Norma editora, Manaus.
- Filgueira FAR (2008) *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. UFV, Viçosa.
- Ferreira DF (2010) *SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3*. UFLA, Lavras.
- Galbieri R, Belot JL (2016) *Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos Cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle*. IMAmt, Cuiabá.
- Gheysen G, Mitchum MG (2011) How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Curr Opin Plant Biol* 14: 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.012>

Golinowski W, Grundler FMW, Sobczak M (1996) Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* 194: 103–116. <https://doi.org/10.1007/BF01273172>

Hongo S, Sato K, Yokoyama R, Nishitani K (2012) Demethylesterification of the primary wall by pectin methylesterase 35 provides mechanical support to the *Arabidopsis* stem. *Plant Cell* 24: 2624–2634. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099325>

Hussey RS, Grundler FMW (1998) Nematode parasitism of plants. In: Perry RN, Wright DJ (eds) *Physiology and biochemistry of free-living and plant parasitic nematodes*. CAB International Press, England, pp 213-243.

Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Hari SG. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Helder%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&author_uid=23809086

Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WM, Perry RN (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 14: 946-961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>

Jones MGK, Payne HL (1978) Early stages of nematode-induced giant cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *J Nematol* 10: 70–84.

Joca TAC, Oliveira DC, Zotz G, Cardoso JCF, Moreira ASFP (2019) Chemical composition of cell walls in velamentous roots of epiphytic Orchidaceae. *Protoplasma* 257: 103-118.

Juvale, PS, Baum TJ (2018) 'Cyst-ained' research into *Heterodera* parasitism. *PLoS Pathog* 14:e1006791. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006791>

Knox JP (1992) Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. *Plant J* 2: 137–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00137.x>

Kyndt T, Vieira P, Gheysen G, de Almeida-Engler J (2013) Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta* 238: 807–818. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1923-z>

Liu L, ShangGuan K, Zhang B, Liu X, Yan M, Zhang L, Shi Y, Zhang M, Qian Q, Li J, Zhou Y. Brittle Culm1, a COBRA-Like Protein, Functions in Cellulose Assembly through Binding Cellulose Microfibrils. *PLoS Genet* 9: e1003704. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003704>

Martin FW (1982) Okra, potential multiple-purpose crop for the temperate zones and tropics. *Econ Bot* 36: 340-345. <https://doi.org/10.1007/BF02858558>

Martini VC, Moreira ASFP, Kuster VC, Oliveira DC (2019) Gallling insects as phenotype manipulators of cell wall composition during the development of galls induced on leaves of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *S Afr J Bot* 127: 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.09.006>

Mitkowski NA, Abawi GS (2003) Nematode de galhas. *The Plant Health Instructor*, EUA.

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry RN, Starr JL, Moens M (eds) *Nemátodos das galhas*. CABI International, Wallingford.

Mota WF, Finger FL, Casali UWD (2000) Olericultura: melhoramento genético do quiabeiro. UFV, Viçosa.

Nguyen PV, Bellafiore S, Petitot AS, Haidar R, Bak A, Fernandez D (2014) *Meloidogyne incognita* - rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. *Rice* 7: 23. <https://doi.org/10.1186/s12284-014-0023-4>

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>

Oliveira RDL, Silva MB, Aguiar NDC; Bergamo FLK, Costa ASV; Prezotti L (2007) Nematofauna associada à cultura do quiabo na região leste de Minas Gerais. *Hort Bras* 25: 88-93. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362007000100017>

Oliveira AS, Silva RA(2013) Ocorrência e patogenicidade de *Meloidogyne javanica* sobre plantas de teca (*Tectona grandis* Linn. F.). *Ciênc Florest* 23: 563-569. <https://doi.org/10.5902/1980509812340>.

Oliveira DC, Magalhães TA, Ferreira BG, Teixeira, CT, Formiga AT, Fernandes GW, Isaias RMS (2014) Variation in the degree of pectin methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall. *PLoS ONE* 9: e94588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094588>

Oliveira DC, Isaias RMS, Fernandes GW, Ferreira BG, Carneiro RGS (2016) Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *J Insect Physiol* 84: 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.012>

Pinheiro JB, Pereira RB, Carvalho ADF, Rodrigues CS (2013) Manejo de nematoides na cultura do quiabeiro. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/960522/manejo-de-nematoides-na-cultura-do-quiabeiro> Accessed 20 august 2020.

Pinheiro JB (2017) *Nematoides em hortaliças Brasília*. Embrapa, Embrapa.

Premachandra DWTS, Gowen, SR (2015) Influence of pre-plant densities of *Meloidogyne incognita* on growth and root infestation of spinach (*Spinacia oleracea* L.) (Amaranthaceae) – an important dimension towards enhancing crop production. *Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society* 3:18-26.

Reddigari SR, Sundermann CA, Hussey RS (1985). Isolation of subcellular granules from second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. *J Nematol* 17: 482-488.

Ridley BL, O'Neill MA, and Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929–967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)

- Ritzinger CHSP, Ritzinger R (2003) Acerola, Ataque às raízes. *Rev Cult Hort Frut* 19: 36 – 38.
- Roland JC, Vian B (1991) General preparation and staining of thin sections. In: Hall JL, Hawes C (eds) *Electron microscopy of plant cells*. Academic Press, London, pp 1–66.
- Sharma RD, Valéria IA, Calvante, MJB.; Gomes AC (2005) Reação de genótipos de pimenta-longa aos nematóides *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* raça 1 e *Rotylenchulus reniformes*. *Nematol Bras* 29: 83-86.
- Siddique S, Grundler FMW (2015) Metabolism in Nematode Feeding Sites. In: Escobar C, Fenoll C (eds) *Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships*. Elsevier, Nova Iorque 73: 119 - 138. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2015.02.001>
- Sikora RA, Fernandez E (2005) Nematodes parasites of vegetables. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (eds) *Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Cabi, Wallingford, pp 319-392.
- Silva MCL, Santos CDG, Silva GS (2016) Espécies de *Meloidogyne* associada a vegetais em microrregiões do estado do Ceará. *Rev Ciênc Agron* 47: 710-719. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160085>
- Silva JBC, Giordano LB, Furumoto O, Boiteux LS, França FH, Bôas GLV, Branco MC, Medeiros MA, Marouelli W, Silva WLC, Lopes CA, Ávila AC, Nascimento WM, Pereira W (2006) Cultivo de tomate para industrialização. https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/atores.htm Accessed: 15 march 2020.
- Smant G, Helder J, Govere A (2018) Parallel adaptations and common host cell responses enabling feeding of obligate and facultative plant parasitic nematodes. *Planta J* 93: 686 – 702. <https://doi.org/10.1111/tpj.13811>
- Taylor AL, Sasser JN (1978) Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). NCSU & USAID Coop Publ, Raleigh.
- Teixeira CT, Oliveira DC, Kuster VC, Isaias RMS. Immunocytochemical demonstration of cell wall components related to tissue compartments in the globoid galls induced by *Clinodiplosis* sp. (Cecidomyiidae) on *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) *Botany* 96: 9-18. <https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0123>
- Vieira P, Escudero C, Rodiuc N, Boruc J, Russinova E, Glab N et al. (2013) Ectopic expression of Kip-related proteins restrains root-knot nematode-feeding site expansion. *New Phytol* 199: 505–5019. <https://doi.org/10.1111/nph.12255>
- Vilela RMIF, Martini VC, Gonçalves L de A, Kuster VC, Oliveira DC (2019) Structure and development of root gall induced by *Meloidogyne javanica* in *Glycine max* L. *Semina: Série botânica* 40:1033-1048. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n3p1033>
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W (2001) Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47: 9-27. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010662911148>

Willats WGT, Limberg G, Bucholt HC, Van Alebeek GJ, Benen, J, Christensen TMIE et al. (2000) Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Res* 327: 309–320. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00039-2)

Williamson VM, Gleason CA (2003) Plant-nematode interactions. *Curr Opin Plant Biol* 6: 327-333. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00059-1)

Wieczorek K (2015) Cell wall alterations in nematode-infected roots. *Adv Bot Res* 73: 61–90. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2014.12.002>

Wolf S, Greiner S (2012) Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249: 169–175. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0371-5>

Zhang R, Feng YLiH, Yuan HX, Dai JL, Cao AZ, Xing LP, Li HL (2016) Cereal cyst nematode resistance gene *CreV* effective against *Heterodera filipjevi* transferred from chromosome of 6VL *Dasypyrum villosum* to bread wheat. *Mol Breed* 36:122. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0549-9>

ARTIGO 2 – THE ROOT-KNOT NEMATODE *Meloidogyne javanica* INFECTION ON *Lactuca sativa* (ASTERACEAE): IMPACTS ON THE AGRONOMIC TRAITS, ROOT AND GALL DEVELOPMENT, AND USE OF *Trichoderma harzianum* (ASCOMYCOTA) AS BIOCONTROL

(VERSÃO PRELIMINAR)
NORMAS DO PERIÓDICO PEST MANAGEMENT SCIENCE

**The root-knot nematode *Meloidogyne javanica* infection on *Lactuca sativa* (Asteraceae):
impacts on the agronomic traits, root and gall development, and use of *Trichoderma
harzianum* (Ascomycota) as biocontrol**

Roberta Mendes Isaac Ferreira Vilela, Vinícius Coelho Kuster, Thiago Alves Magalhães,
Caroline Lemes Sousa, Laiz Morgana Almeida Pereira, Vitor Campana Martini and Denis
Coelho de Oliveira

Abstract

Due the high importance of *Lactuca sativa* L. (Asteraceae), the lettuce, in human diet in the economy, and high suitability for small farm by its capacity for adaptation to several environmental conditions, we evaluate the impact of the nematode *Meloidogyne javanica* Treub. (Heteroderidae) on the agronomic traits and development of this vegetable. In addition, we evaluated whether the application of the fungus *Trichoderma harzianum* Rifai (Hypocreaceae) is effective in controlling root-knot nematodes in this crop. Our results showed different impacts generated by *Meloidogyne javanica* galls on the roots structure and agronomic traits of the lettuce. There was an increase in root fresh weight per root length in the treatment with nematodes and a decrease of the width of the aerial part. Our multiple regressions analyses indicate a relation between the agronomical traits that could represent a lost in productivity in the adult individual. The treatments with *M. javanica* + *T. harzianum* also exhibited the smallest lettuce plants and a negative relationship with the number of leaves. Despite that the fungus seems to be not efficient controlling root-knot nematode in our study na concentração testada. The galls development is the most visible symptom of a *M. javanica* infection in lettuce and a useful trait for field diagnosis. These galls generally have a rounded shape and, in the Lisa Inês cultivar, they were observed for the first time at 12 DAI (Days After Inoculation) in both treatments, with the nematode and nematode and *T. harzianum* showing grade 3 susceptibility. 27 DAI formed a well-formed feeding site, altering the vascular root system.

Keywords: nematode. lettuce. vegetable. galls. biological control.

1 Introduction

Lactuca sativa L. (Asteraceae), the lettuce, is one of the most marketable vegetables in human diet¹ and in addition it is highly suitable for small farm by its capacity for adaptation to several environmental conditions.² This species presents a relatively short production cycle, 45-60 days, which make possible a year-round production with quick financial feedback.³ However, there are a lot of lettuce cultivars susceptible to pathogens, especially root-knot nematodes, that may compromise consecutive cycles when in high population numbers.⁴

Different species of root-knot nematode occurs in the regions where lettuce are cultivated in Brazil, such as *M. incognita* and *M. javanica* Treub. (Heteroderidae) being the most harmful species to the cultivar. ⁴*Meloidogyne* spp. are obligate-endoparasites of underground organs.⁵ The infection by this nematode begins with the juveniles (J2) penetrating the root, migrating through the cortex, and settling in the vascular cylinder.⁶ Then, the females become sedentary and start inducing giant multinucleate cells from which the nematodes feed.^{6,7,8}

A symptom of root-knot nematode infection in the root host is the formation of galls,⁹ although these gall formations is not mandatory in the interaction with the parasite.¹⁰ The time of gall and giant cell formation depends on the infected host plant and the species of nematode as similarly occur in okra (*Abelmoschus esculentus*) and the soybean (*Glycine max*) inoculated with *M. incognita* and *M. javanica*. On these systems, both galls and giant cells were detected 11 days after nematode inoculation.⁸ The development of giant cells may be quicker during the infection cycle, like two days for rice (*Oryza sativa*) infected by *M. graminicola*,¹¹ and nine days for banana genotypes infected with *M. incognita*.¹² From a histological perspective, nematode galls result from the tissue hyperplasia and cell hypertrophy of vascular tissue and root cortical parenchyma,¹³ with the highly specialized giant cells originating from vascular cells.¹⁴

The giant cells and gall formation may provoke a histological disorganization of the vascular cylinder and to the obliteration of the vessel elements of xylem.¹⁵ Such changes can hamper the water flux and nutrients translocation in the host plants and cause symptoms such as yellowing, wilting and reduced development of plant organs.^{16,17} In the susceptible lettuce cultivars, the root-knot infections can decrease the leaf volume¹⁸ reducing the quality and production^{19,20} of the culture and potentially making fresh consumption unfeasible. The level of damage caused by nematodes varies with their initial densities in the soil, the environmental conditions, and the susceptibility of the host.²¹ Although losses in quality and

production range between 10-20% in nematode-infected leafy vegetables,²⁰ losses caused by *Meloidogyne* spp. can reach 100% of the production.²² Hence, there is a growing demand for better understanding the mechanisms of nematode infection, gall and giant cell formation, and control of the parasite population in the soil.

In a general way, the control of pathogenic nematodes is done through cultural practices, most commonly, soil turning, irrigation after turning, fallowing, biofumigation, flooding, green manuring, crop rotation, and chemical control with nematicides applied directly in the soil.^{23,24} However, the use of chemical products for controlling populations of nematodes has become increasingly restricted, due to their low control efficacy and high toxicity.²⁵ In the case of lettuce, residues of these chemicals can remain in the leaves until consumption and pose risks to human health, since these plants have a short production cycle.²⁶ Fungi and bacteria are prominent organisms in the biocontrol of plant pathogens, with fungi of the genus *Trichoderma* spp. being one of the most used.²⁷ These fungi can directly and indirectly suppress nematodes through the production of toxic compounds, such as lytic enzymes that degrade the chitin present in nematode eggs and can induce resistance in cultivated plants.²⁸ Mycoparasitism, competition for nutrients, and antibiosis are used by *Trichoderma* spp. in an antagonistic way to also control fungi and bacteria populations and promote growth in plants, further increasing their defense against pathogens.²⁹

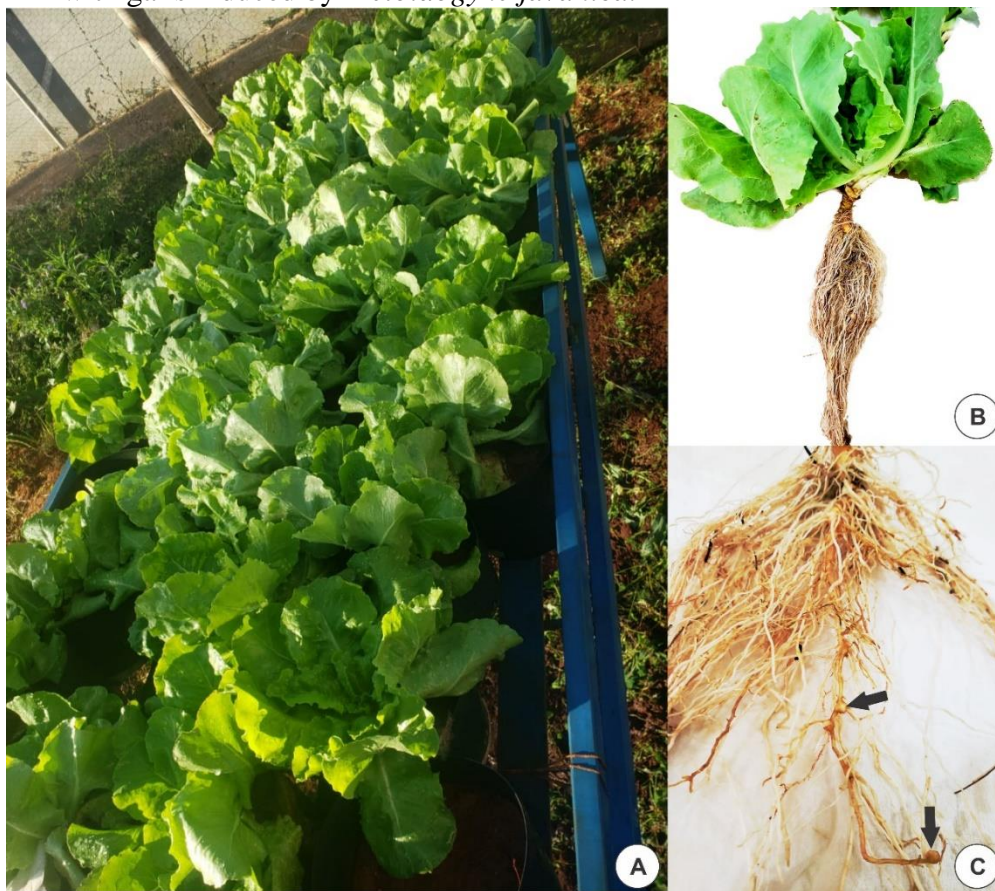
Given the importance of lettuce in human nutrition and economy, this study seeks to understand i) the impact of the nematode *M. javanica* on the agronomic traits and development of lettuce. ii) In addition, we evaluated whether the application of the fungus *Trichoderma harzianum* Rifai (Hypocreaceae) is effective in controlling nematodes in this crop, thus changing the effects of the nematode on lettuce development and on the total number of galls formed. We believe that the development of the nematode in the lettuce will disrupt the root vascular system and promote a reduction in the productivity due to resource competition with the root-knot development site. In treatments with the fungus *T. harzianum* we expect a lower impact on productivity since it will reduce the multiplication of this pathogen.

2 Material and methods

2.1 Experiment setup

The experiment was carried out in the greenhouse of UniCerrado, a University Center in the Goiatuba municipality (18° 00' 45" S, 49° 21' 17" W), Goiás state, Brazil, from March to May 2020. The temperature of the greenhouse was monitored using a hygrometer, varying between 20-35° C throughout the experiment. The lettuce cultivar Lisa Inês, Sakata® (Fig. 1 A) was selected for its susceptibility to *Meloidogyne* spp., being more affected by them when compared to curly type cultivars.^{30, 31, 32} The Lisa cultivar presents smooth leaves and does not have a cabbage-like head, but rather a rosette of leaves.³³

Figure 1. Morphological characteristics of the cultivar Lisa Inês lettuce (*Lactuca sativa* L.) with galls induced by *Meloidogyne javanica*.



Legends: **A-** Cultivar used in the experiment; **B-** Aerial and root systems; **C-** Gall occurrence (arrows) in the roots.

The lettuce seeds were sown into 2 polyethylene trays (98 cells) containing the Carolina Soil® substrate. After 20 days of emergence, the seedlings were transplanted to 2.8 L pots containing soil mixture substrate (dystrophic red latosol) and 1:1 sand. The substrate adbeen previously sterilized in an autoclave at 120° C for one hour. At the time of transplantation, 1.8 ml of a solution containing 5,000 juveniles (J2) of *M. javanica* were inoculated into 100 plants using a pipette. The nematodes used had been previously identified

to species level, inoculated into susceptible tomato (*Solanum lycopersicum*) plants for multiplication, and extracted from the root galls by the method of Coolen and D'Herde³⁴. In addition to the nematode inoculation, 50 of these 100 pots also received a biological product which shows necrotrophic mycoparasite properties natural to soils (that is, *T. harzianum*), and is effective in controlling numerous phytopathogenic fungi and nematodes.³⁵ The compound (80 mL) had been diluted in water at the recommended by the manufacturer (0.0667 mL / 4 L of water). For the control group, 50 plants were kept with no nematode inoculation and/or use biological product then totaling three treatments (50 uninoculated plants, 50 with *M. javanica*, and 50 with *M. javanica* + *T. harzianum*). With three treatments and 10 repetitions, with each plot consisting of 5 vessels. Treatments were randomly distributed inside the greenhouse. Then, 15 days after transplantation, we placed 8 g of the formulated Forth Cote (15-09-12) in each pot for plant nutrition.

2.6 Agronomic traits and galls

The Lisa Inês cultivar presents an early cycle of 54 days,³⁶ so at 50 DAI (days after inoculation) the experiment was disassembled and the productivity data were collected. The plants were carefully removed from the pot, the roots were washed for soil removal and placed on paper towels for water retention. We then obtained the following parameters: (i) shoot fresh weight (SFW)(g) and (ii) root fresh weight (RFW) (g), using the Balmak ELP-10 analytical balance; (iii) root length (RL) (cm), using a ruler; (iv) stem/crown diameter (SCD) (g), using a caliper to measure the middle region of the stem; (v) number of leaves (plant) (NL), and (vi) width of the aerial part (WAP) measured with a ruler and considering the largest end-to-end diameter of two opposing leaves in the plant.

To evaluate Lisa Inês resistance against *M. javanica*, we secluded and ranked the galls in a 0-5 scale, where 0 = no galls; 1 = 1-2 galls; 2 = 3-10 galls; 3 = 11-30 galls; 4 = 31-100 galls; and 5 = more than 100 galls, as proposed by³⁷ for the gall index. Plants presenting up to 10 galls (Grades 0-2) were classified as resistant, and those with ≥ 11 galls (Grades 3-5) as susceptible. To assess cultivar susceptibility and nematode development, we removed the roots from the soil and counted all galls per plant individual. To estimate the nematode population in each plant, we extracted the parasites from the galls through the technique of Coolen and D'Herde³⁴, in which each root is cut and ground with water and hypochlorite and sieved multiple times. During the extraction, Kaolin (clay powder) and a sucrose solution

were added. The material was centrifuged at different times, and, at the end, the nematodes were obtained from the supernatant. To quantify the nematodes, we standardized the weight of the smallest root (5 g) and calculated a rule of three for all roots with greater weight.

To determine the final nematode population in the soil, we removed 200 g of substrate from each pot at the time of lettuce removal for analysis and placed them in properly identified paper bags. They were taken to the laboratory and, after homogenization in water and sieving, the flotation-centrifugation methodology proposed by³⁸ was used. After centrifugation and insertion of a sucrose solution (454 g sugar/1 L water), the nematodes retained in the 500-mesh sieve were transferred into plastic cups and identified in a water suspension medium. To count the nematodes in the root and in the soil, we used a binocular microscope (Bioval[®] L-1000b-AC) and the Peters counting chamber.

2.7 Morphological and anatomical characterization

Morphological and anatomical analyzes were performed on root and gall fragments when the feeding site was already well established in the inoculated roots: (i) roots inoculated with *M. javanica* 27 DAI; (ii) roots inoculated with *M. javanica* and *T. harzianum* 27 DAI; and (iii) uninoculated roots 27 DNI (days after non-inoculation). Root and gall samples were photographed with a stereoscopic microscope (Leica[®] EZ4 HD) for morphological characterization. For the anatomy, samples of uninoculated roots were taken from parts equivalent to those with gall occurrence on inoculated roots. The galls were selected randomly.

After collection, samples were fixed in 4% paraformaldehyde³⁹ and stored in 70% alcohol. The samples were then dehydrated in an ethylic series (85 and 95%), soaked in 2-hydroxyethyl methacrylate, and sectioned in a rotating microtome at 6 μm thick. The sections were stained with 1% toluidine blue, pH 4.0⁴⁰ and mounted with Entellan[®]. All samples were analyzed and photographed with a Leica[®] DM500 photomicroscope coupled with a Leica[®] ICC50HD camera.

2.8 Statistical analyses

The collected data were submitted to analysis of variance (ANOVA) to test the difference between the absolute values of the development variables and the treatments. To test the difference between groups we used a Tukey HSD test. In order to know if the

treatments influence the relationship between agronomic traits, we performed multiple regressions using characteristics of economic interest (shoot fresh mass; lettuce head width, number of leaves) with root fresh mass as a response variable and the other traits as predictors. Treatments were used as a fixed factor and interacting with all predictors. To test cultivar resistance against nematode infestation and whether *T. harzianum* offers resistance against gall induction, multiple regression models were used with total galls as the response variable. The predictor variables were the two treatments with nematode inoculation, the agronomic traits, the total number of nematodes in the soil and in the root, and the interaction between factors.

All variables were standardized using the “scale()” function of the R software⁴¹ so that the magnitude scale was comparable within the multiple model. We used the model selection function of the statistical package “MuMIn”⁴² to determine the best model. Models were selected using the Akaike's Information Criterion (AIC) method⁴³ and all models with $\Delta \text{AIC} < 2$ were considered plausible. As a simplification criterion, the most parsimonious model was highlighted. The graphs were made using a bivariate relationship between each predictor variable and the response, using the treatment as a grouping variable to separate the lines drawn by the “ggplot2” package.⁴⁴ The relationships within each result table, however, represent complete models where the treatment was considered a random and fixed factor.

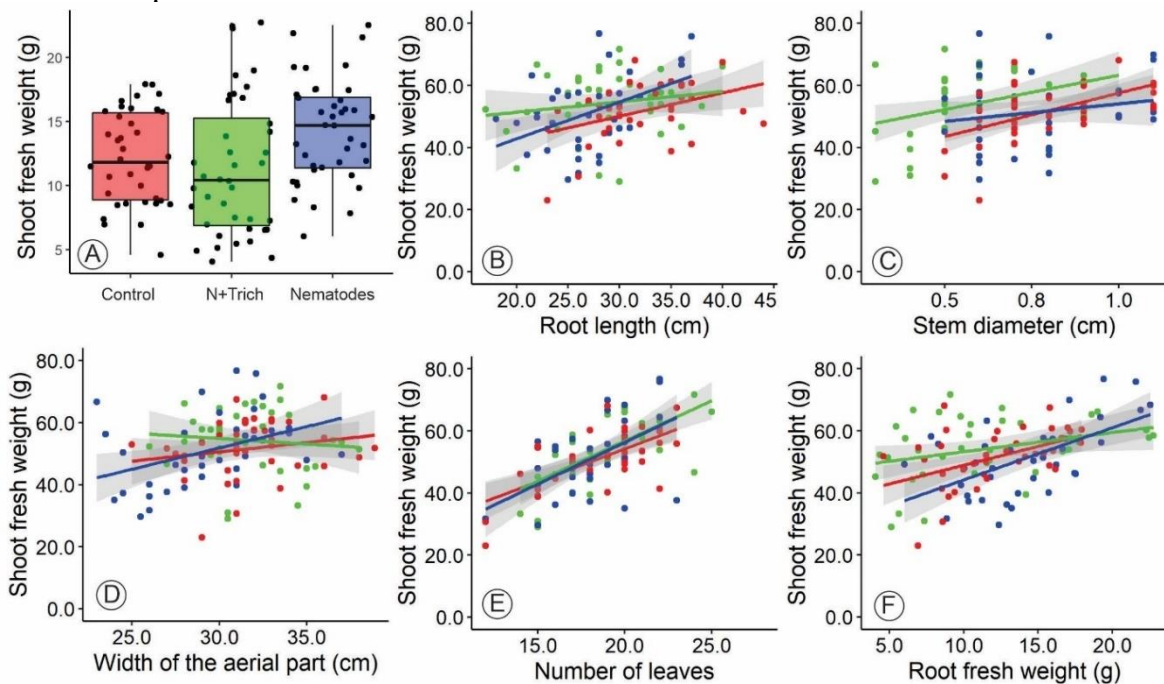
3 Results

At 50 DAI galls were found in both plants inoculated with *M. javanica* (17.52 ± 18.0) and in those with *M. javanica* + *T. harzianum* (12.42 ± 9.2). The lettuce variety used in the experiment presented a Grade 3 (11 to 30 galls) of susceptibility to *M. javanica*, following Taylor and Sasser³⁷. We also detected differences in the absolute values between agronomic traits and in the relationship between them when comparing the treatments.

The shoot fresh weight (SFW) was similar between treatments, but the relation between SFW and the other agronomic traits differed between them (Fig. 2A-F), with the SFW being positively related to the number of leaves (Fig. 2E, $b = 7.47$), width of the aerial part (Fig. 2D, $b = 4.56$), stem diameter (Fig. 2C, $b = 1.56$) and root length (Fig. 2B, $b = 0.98$) in the most parsimonious model (Table 1, Model 120, Appendix BA). It is also related to root fresh weight (RFW, Fig. 2F, $b = 0.93$). In plants inoculated with *T. harzianum*, we found a significant relationship between SFW and root fresh weight (RFW) and root length (Fig. 2B, D and F), but it was a weaker relationship compared to the other treatments, with less weight

gained for each unit of length of the root infested with *T. harzianum*. The plants inoculated with the fungus also had the greatest SFW per crown diameter, while the other treatment with nematodes presented the lowest values for these traits and no relation between the increase in crown diameter and SFW. The treatment with *T. harzianum* presented an inverse pattern to the other treatments, with lower fresh weight in relation to the width of the aerial part.

Figure 2. Multiple regressions using shoot fresh weight (SFW) as a response and the treatments and plant development of cultivar Lisa Inês lettuce, variables as predictors.

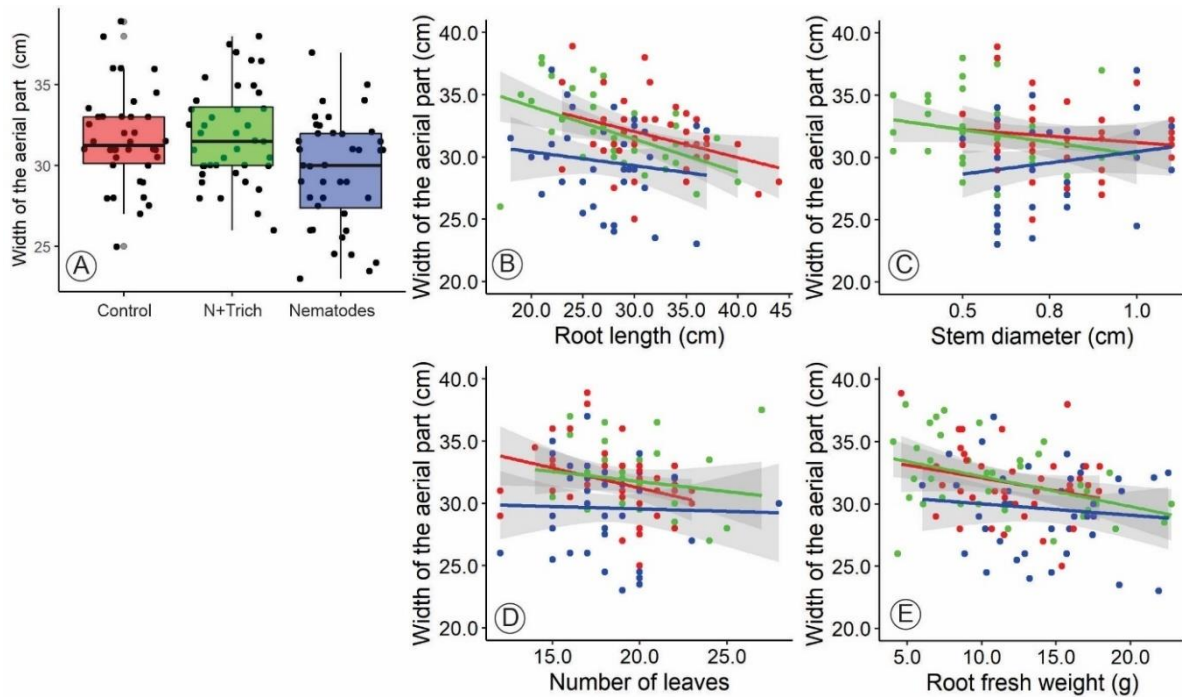


Legends: Red = Control (Uninoculated plant); Green = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*) and trichoderma (*T. harzianum*); Blue = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*).

The width of the aerial part differed between treatments ($F_{1,115} = 6.33$; $p < 0.01$) (Fig. 3A). This trait was directly related to all agronomic traits within the models with delta AIC < 2 (Table S1). The strongest relationship was with SFW (Fig. 2D, $b = 2.08$), followed by negative relations with the number of leaves (Fig. 3D, $b = -1.57$) and root length (Fig. 3B, $b = -1.04$) within the most parsimonious model (Table 2, model 54, Appendix B). It was also negatively related to RFW (Fig 3E, $b = -0.52$) and stem diameter (Fig. 3C, $b = -0.23$). Regarding the treatments, we could notice that plants inoculated only with *M. javanica* presented a smaller width of the aerial part, compared to the control and to the treatment with *T. harzianum*. The treatments also had an effect on the relationships between the agronomic traits, and while the nematode treatment had the lowest width of the aerial part and increased

width for each unit of stem diameter, the other two treatments showed a tendency to decrease width in larger stems.

Figure 3. Multiple regression using width of the aerial part (WAP), as a response and the treatments and plant development of cultivar Lisa Inês lettuce, variables as predictors.



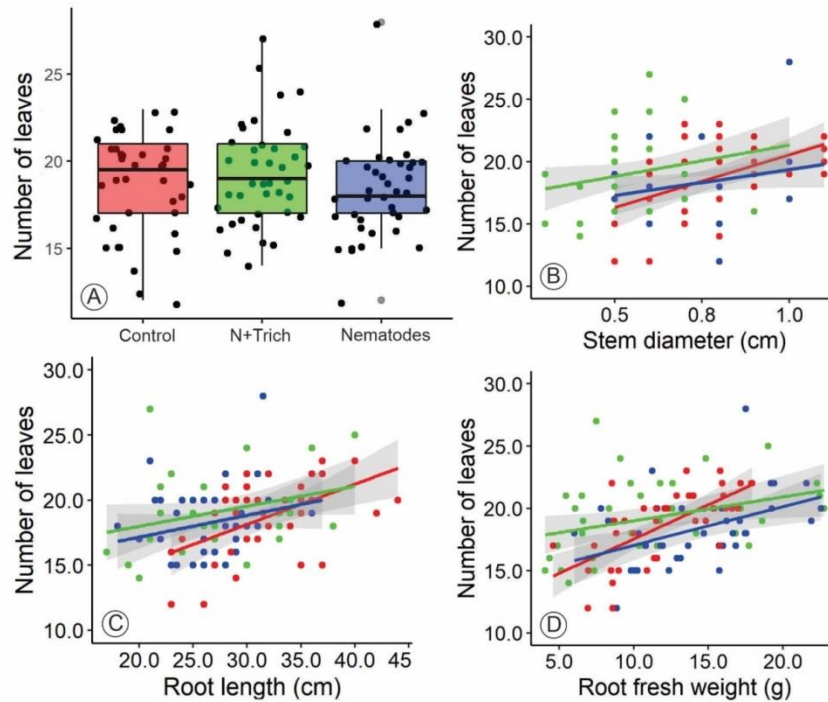
Legends: Red = Control (Uninoculated plant); Green = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*) and Trichoderma (*T. harzianum*); Blue = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*).

We found no difference in the number of leaves between treatments (Fig. 4), but this variable was still related to the remaining agronomic traits (Fig. 4A-C). Within the most parsimonious model, the number of leaves had a positive relationship both with SFW, which was the trait with the greatest effect on this variable ($b = 2.09$), and RFW ($b = 1.24$), and a negative relationship with width of the aerial part ($b = -0.91$) (Table 3, model 1085, Appendix C). The number of leaves was also related to the root length ($b = 0.41$), and the crown diameter ($b = 0.16$). The treatments influenced the relationships between the number of leaves and root fresh weight and also with root length, where the control presented the greatest increase in the number of leaves per unit of root fresh weight and length when compared to the two treatments.

A difference in RFW was noted between the two treatments (Fig. 5A), with the treatment using *T. harzianum* presenting the lowest values. In addition, the treatments also affected the relationship of RFW with other agronomic traits (Fig. 5B, C). Within the more

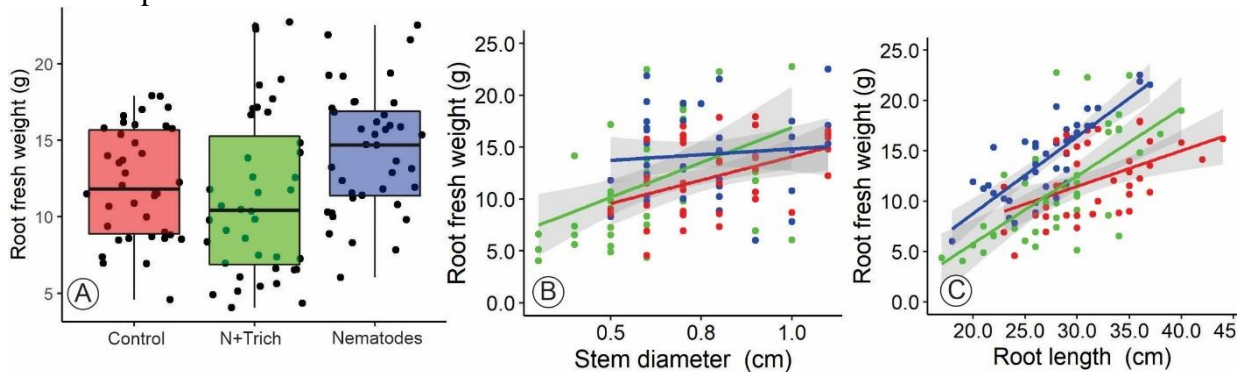
parsimonious model, root length had the greatest positive influence on RFW ($b = 1.13$), followed by stem diameter ($b = 1.05$) and number of leaves ($b = 0.9$) (Table 4; Model 116, Appendix D). The treatments with nematodes presented a greater increase in weight per unit of root length. The treatment with the fungus also showed lower root fresh weight values in larger lettuce (SFW and Width of the aerial part) plants.

Figure 4. Multiple regression using as number of leaves (plant) (NL) a response and the treatments and plant development of cultivar Lisa Inês lettuce, variables as predictors.



Legends: Red = Control (Uninoculated plant); Green = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*) and trichoderma (*T. harzianum*); Blue = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*).

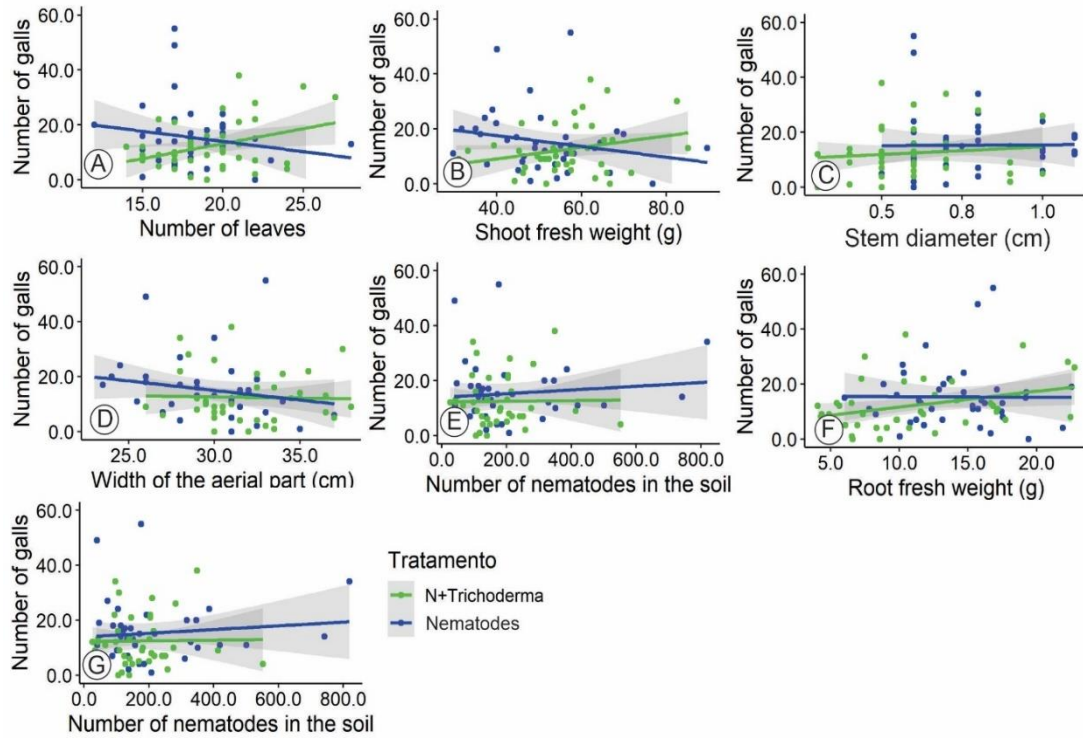
Figure 5. Multiple regressions using root fresh weight (RFW) as a response and the treatments and plant development of cultivar Lisa Inês lettuce, variables as predictors.



Legends: Red = Control (Uninoculated plant); Green = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*) and trichoderma (*T. harzianum*); Blue = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*).

The number of nematodes in the soil and in the roots did not differ between the treatments of inoculated plants. Despite this, there was an effect of the treatments on the relations between number of galls and the agronomic traits or the abundance of nematodes (Fig. 6). The traits influenced by number of galls were RFW (Fig 6F, $b = 0.17$) and SFW (Fig. 6B, $b = 0.09$), stem diameter (Fig. 6C, $b = -0.15$), number of root nematodes (Fig. 6G, $b = 0.15$), number of leaves (Fig. 6A, $b = 0.14$) and width of the aerial part (Fig. 6D, $b = 0.09$). The effect of number of galls on RFW was different between treatments, with a greater increase in root fresh weight per gall in the treatment with *T. harzianum*. The increase in number of galls is also related to increase of shoot fresh weight in the treatment with *T. harzianum*. The treatment also changed the relationship between number of galls and stem diameter, which despite being positively related to number of galls, is not influenced by treatments. As with the weight of aerial part, the number of nematodes in the soil is negatively related to number of galls ($b = -4.59$), but it does not present the same relationship within the treatments. For width of the aerial part, only the treatment without the fungus presented a negative relationship with the number galls.

Figure 6. Multiple regressions using galls as a response and the treatments and plant development of cultivar Lisa Inês, lettuce variables as predictors.

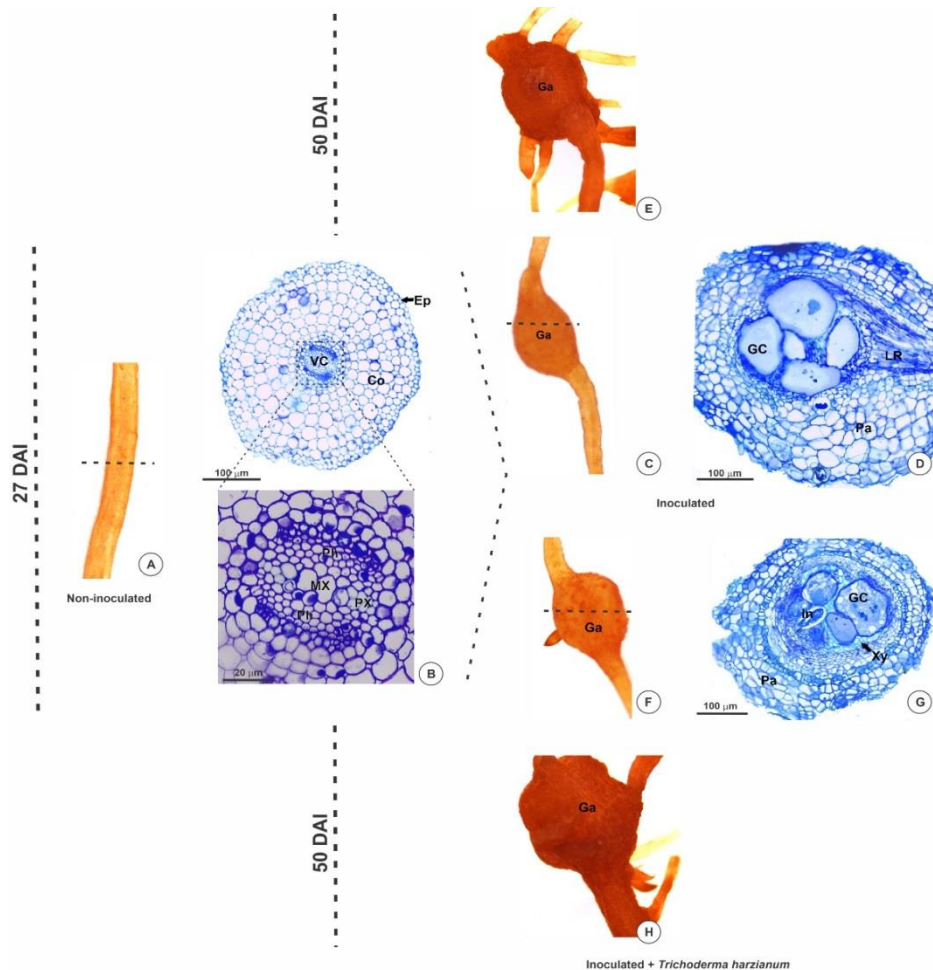


Legends: Green = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*) and Trichoderma (*T. harzianum*); Blue = Plant inoculated with nematode (*M. javanica*).

3.1 Anatomy and morphology of lettuce roots and galls

The uninoculated roots (Fig. 7A) presented only primary growth, with a uniseriate epidermis covered by a thin cuticle, a cortical parenchymal and a diarchal vascular cylinder (Figure 7B). This anatomical structure was maintained from 27 DNI (Fig. 7B) to 50 DNI.

Figure 7. Morphological and histological traits of cultivar Lisa Inês lettuce: uninoculated (A, B), inoculated with *Meloidogyne javanica* (C, D, E) and inoculated with *M. javanica* + *Trichoderma harzianum* (F, G, H). A, B, C, D, F, G are 27 days after inoculation (DAI); E, H are 50 DAI; A- Absence of galls; B- Root in primary structure, with uniseriate epidermis, parenchymal cortex and diarchal vascular cylinder; C, E- Presence of galls; D, F- Treatments with histological similarity, presence of giant cells in the vascular cylinder and surrounded by hypertrophied parenchymal cells.



Abbreviations: Ep- Epidermis; CG- Giant cell; Co- Cortex; Ga- Galls, LR- Lateral root; PX- Protoxylem; MX- Metaxylem; Ph- Phloem; Pa- Parenchyma; In- Inductor; VC- Vascular Cylinder; XY-Xylem.

The inoculated roots with *M. javanica* and *M. javanica* + *T. harzianum* have morphologically similar spherical galls (Fig. 7C, E, F, H) already noticeable at 12 DAI. The galls kept growing in diameter throughout the experiment, as evidenced by the increasingly larger galls collected 27 DAI (Fig. 7C, F) and 50 DAI (Fig. 7E, H). The two nematode treatments also shared a similar anatomical structure, characterized by a disorganized vascular system (Fig. 7 D, G). The cortical cells suffered intense hyperplasia and hypertrophy, which

caused a rapid increase in their extension (Fig. 7D, G). Lateral roots were frequently observed and were formed by external portions of the vascular cylinder around the gall (Fig. 7D).

The formation of giant cells occurred at 12 DAI in the central portion of the vascular cylinder, which led to the displacement of xylem and phloem cells to more peripheral regions and the compression of these tissues (Fig. 7D, G). The cylinder normally presented two to five giant cells, a thick cell wall, a dense, multinucleated cytoplasm, and multiple small vacuoles (Fig. 7D, G). Females were in contact with the giant cells and fed directly on them (Fig. 7G).

4 Discussion

Our results showed different impacts generated by *M. javanica* galls on the roots structure and agronomic traits of the lettuce. There was an increase in root fresh weight per root length in the treatment with nematodes. We could also note that root fresh weight was not related to shoot fresh weight in the treatment with *T. harzianum*, producing lighter lettuce leaves, but heavier roots. The width of the aerial part was smaller for the heaviest roots, which were those from the treatments with the nematodes. In the treatment without *T. harzianum*, the number of galls showed a negative relationship with the number of leaves. However, in the treatment with the fungus this relationship was positive. Despite the number of galls increasing along with root increase, it continued to produce more leaves and heavier shoot fresh weight.

4.1 Impact on agronomic traits

The induction of phytoparasitic nematodes can reduce the productivity from 7% to 50% in crops of economic interest worldwide.^{48,49} Damage caused by root-knot nematodes in vegetables can be expressed as a reduction in production or a decline in the quality of the product to be marketed.⁵⁰ However, the infestation of *M. javanica* on Lisa Inês lettuce did not generate significant reductions in in the most of agronomical traits analyzed. However our multiple regressions analyses indicate a relation between the variables that seems to represent a lost in productivity in the adult individual. Here, although the shoot fresh weight showed a positive relationship with the other agriculture variables, there was no difference in shoot fresh weight between the treatments. However, parasitism by *M. incognita* reduced the aerial parts in the “Babá de Verão”, “Brisa”, and “Lucy Brown” lettuce cultivars, also evaluated

under greenhouse conditions.^{51,52} The treatment with *M. javanica* and without fungus showed a reduction in width of the aerial part and a negative relationship with most of the agronomic traits tested. There was no significant difference in the number of leaves between treatments, but the control had greater gain of leaves per root length and fresh weight. For lettuce plants, root-knot nematode infestation can cause stand failure (plant population), lower growth, smaller and lighter lettuce heads, and looser yellowish leaves.⁵³ In addition, a reduced size of the head or aerial part and a lower leaf volume cause economic loss to the producers.^{54,20}

In soybean, that the use of *T. harzianum* led to an increase in root weight and length.⁵⁵ Herein, we found that inoculated plants with *M. javanica* had heavier root fresh weight compared to non-inoculated plants and those inoculated with *M. javanica* + *T. harzianum*. The weight gain in the roots of plants inoculated with *M. javanica* may be due to the presence of galls, which are protuberances or thickenings formed by the increase in the number and size of cells in the host organ.⁵⁶ Galls are classic drains of photoassimilates and strong competitors for resources.^{57,58} Cytological processes triggered by the nematodes increase the weight of the gall induction site, as well as the production of secondary roots, something that often occurs in mild nematode-induced infections and that can also interfere with the final root fresh weight.⁶⁰ The tolerance of Lisa Inês lettuce to the presence of nematodes without harming crop productivity has also been reported for other plant species, as highlighted by Charchar and Moita¹⁸ and Santos⁶¹, who cite normal plant development and no loss of productivity for cultivars even in intense gall occurrence. According to Fiorini et al⁶², this tolerance may be related to good soil mineral nutrition associated with the abundance of the root system.

Flat lettuce cultivars, preferred by some consumers, are more susceptible to *Meloidogyne* spp.¹⁸ However, our study showed that the lettuce cultivar Lisa Inês was considered Grade 3 (11-30 galls) in the Taylor and Sasser scale, which means it did not present a high susceptibility to *M. javanica*. *M. javanica*, when compared to other vegetables.

The incidence of galls is an important feature in the selection for marketable lettuce cultivars with greater resistance to root-knot nematodes.^{63,64,65} In addition, the use of *T. harzianum* was inefficient to prevent gall formation and significantly reduce the number of nematodes in the soil and roots. However, the use of *T. harzianum* had a positive impact on head diameter in the treatment with nematodes. In Silvety hybrid tomato, *T. harzianum* led to a decrease of *Meloidogyne* spp. in the soil⁶⁶ as also happened in a study with common beans.⁶⁷ Peixoto et al⁶⁸ mentions that the greater the number of nematodes infecting the roots of lettuce plants, the smaller is the amount of water and nutrients that reach the leaves,

causing a decrease in commercial production. Even though *T. harzianum* harzianum is not efficient for biological control in our study, it would be interesting to test other dosages and the combination with other techniques such as solarization and crop rotation can keep root-knot nematodes below the level of economic damage.

4.2 Anatomical analyses

The presence of galls is the most visible symptom of a *Meloidogyne* spp. infestation,¹³ and a useful trait for field diagnosis. These galls have generally a rounded shape.²⁰ In the Lisa Inês cultivar, they were first noticed at 12 DAI in both treatments with the nematodes. The appearance of galls within a similar period has also been reported for gall inductions by *M. incognita* in okra (11 DAI)⁸ and by *M. javanica* in soybean (11 DAI).⁷

As soon as the female root-knot nematode establishes itself in the galls, she starts to form multinucleated giant feeding cells.²⁰ These giant cells were also reported here functioning as the feeding site of *M. javanica*. Giant cells are common in root galls induced by nematodes, as already demonstrated for cotton *Glossipium hirsutum* parasitized by *M. incognita*,⁴⁵ and for the roots of 'Magnet' and 'Helper M' tomato *Solanum lycopersicum* rootstocks inoculated with *M. enterolobii* and *M. javanica*,⁴⁶ with the appearance of giant cells 18 DAI and 10 DAI, respectively. In our study, a well-formed feeding site was noticed in the vascular cylinder at 27 DAI, which was similar for *Musa acuminata* parasitized by *M. incognita* (24 DAI), which presented hypertrophied and hyperplastic undifferentiated root cortical cells, and a disorganized vascular cylinder with giant cells.¹² This can obliterate part of the xylem vessel elements and cause the total disorganization of the vascular cylinder,¹⁵ with potential to reduce the transport of water and nutrients by the xylem.⁴⁷

5 Conclusion

- i) The species *M. javanica* triggers the formation of galls and giant cells on lettuce, cultivar Lisa Inês, 12 days after inoculation, with a consequent reduction in the width of the shoot and changes in the root system, due to the grade 3 susceptibility of the cultivar.
- ii) The use of the fungus *T. harzianum* at the concentration tested does not reduce the number of galls on plants and soil nematodes in lettuce, cultivar Lisa Inês.

References

- 1 Sala FC, Costa CP. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. *Horticultura Brasileira* **30**: 187-194 (2012).
- 2 Medeiros DC, Lima BAB, Barbosa MR, Anjos RSB, Borges RD, Cavalcante Neto JG, Marques LF, Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. *Horticultura Brasileira* **25**: 433-436 (2007).
- 3 Maldonade IR, Mattos LM, Moretti CL. *Manual de boas práticas agrícolas na produção de alface*. Embrapa Hortaliças. Fev, ps. 44 (2014).
- 4 Pinheiro JB, Pereira RB, Carvalho ADF, Rodrigues CS. *Manejo de nematoides na cultura da alface*. Brasília, DF.: Embrapa: CNPH, (Embrapa-CNPH. Circular Técnica, 124) ps. 7 (2013).
- 5 Pinheiro, JB, *Nematoides em Hortaliças* Brasília: DF: Embrapa. ps. 194 (2017).
- 6 Henz GP, Suinaga F. *Tipos de alface cultivadas no Brasil*. Brasília: Embrapa Hortaliças. (Comunicado Técnico, 75) ps.7 (2009).
- 7 Vilela RMIF, Martini VC, Gonçalves LDA, Kuster VC, Oliveira DC. Structure and development of root gall induced by *Meloidogyne javanica* in *Glycinemax* L. *Semina: Ciências agrárias*.<https://doi.org/10.5433/1679-0359>. 2019 **40**:1033–1048 (2019).
- 8 Vilela RMIF, Kuster VC, Magalhães TA, Moraes CA, De Paula Filho AC, De Oliveira DC. Impact of *Meloidogyne incognita* (nematode) infection on root tissues and cell wall composition of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench, Malvaceae). *Protoplasma* <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01618-0> Epub ahead of print. PMID: 33532872 (2021).
- 9 Mitkowski NA, Abawi GS. Nematóide de galhas. (Portuguese translation by E.A, Lopes, R. Dallemole-Giaretta and B.S. Vieira, 2011) *The Plant Health Instructor*, EUA. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2011-0329-01> (2003).
- 10 Ferraz LCCB, Monteiro AR. Nematoides. In: Bergamin Filho A, Amorim L, Rezende JAM. *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*, ed. 4. São Paulo. pp. 168-199 (2011).
- 11 Nguyễn PV, Bellafiore S, Petitot AS et al. *Meloidogyne incognita* - rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. <https://doi.org/10.1186/s12284-014-0023-4> *Rice* **7**: 1-13 (2014).
- 12 Castañeda NEN. *Estudo da interação Musa acuminata-Meloidogyne incognita*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade de Brasília, Brasília. ps. 267 (2015).
- 13 Morillo SRC, Silva GS. Efeito antagônico de feijão-de-porco sobre *Meloidogyne enterolobii* em tomateiro. *Summa Phytopathologica*,[https://doi.org/10.1590/0100-5405/205941\(4\)pp.305-310](https://doi.org/10.1590/0100-5405/205941(4)pp.305-310) **41** (4) pp. 305 - 310 (2015).

- 14 Karssen G, Moens, M. Root-knot nematodes. *In*: Perry RN, Moens M (Eds.). *Plant nematology*. Wallingford: CABI Publishing, pp. 59-90 (2006).
- 15 Wanderley MJA, Santos JM. Resistance of sweet potato cultivars to *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília **29** (4): 437-440 (2004). <https://doi.org/10.1590/S010041582004000400014>
- 16 Anwar SA, Javed N. *Meloidogyne incognita* infecting Dahlia. *Pakistan Journal Zoology*. **42**: 348-350 (2010).
- 17 Premachandra, DWTS, Gowen SR. Influence of pre-plant densities of *Meloidogyne incognita* on growth and root infestation of spinach (*Spinacia oleracea* L.) (Amaranthaceae) an important dimension towards enhancing crop production. *Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society*, **3**: 18-26 (2015).
- 18 Charchar JM, Moita AW. *Metodologia para seleção de hortaliças com resistência a nematoides: Alface/Meloidogyne spp*. Brasília: Embrapa Hortaliças, ps 8 (2005).
- 19 Charchar JM. *Nematoides em hortaliças*. Brasília: Embrapa-CNPq (Embrapa-CNPq. Circular técnica, 18) ps.12 (1999).
- 20 Pinheiro JB, Amaro GB, Pereira RB. *Ocorrência e controle de nematoides em hortaliças folhosas*. (Circular Técnica 89). Brasília: Embrapa-CNPq. ps 10 (2010).
- 21 Lopes EA, Ferraz S. Importância dos fitonematoides na agricultura. *In*: Oliveira CMG, Santos MA, Castro LHS (Org.). *Diagnose de fitonematoides*. Campinas: Millennium, ps.14 **1** (2016).
- 22 Pinheiro JB, Melo RA de C; Ragassi CF. *Manejo de nematoides em hortaliças sob plantio direto*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, Embrapa Hortaliças - Circular Técnica (INFOTECA-E), ps. 22 (2019).
- 23 Dias WP, Asmus GL, Carneiro GE De S. Manejo integrado de nematoides na cultura da soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, **28**: 30-33 (2003).
- 24 Dutra MR, Campos VP. Manejo do solo e da irrigação como nova tática de controle de *Meloidogyne incognita* em feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, **28**: 608-614 (2003).
- 25 Araújo FF, Bragante RJ, Bragante CE. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia-GO. **42**: 52-60, (2012).
- 26 Moreno MB, Corrêa APA, Krolow ACR, Leite TB, Rombaldi CV, Gomes CB. Análise das folhas de alface CV. elisa submetida a diferentes tratamentos com torta de mamona no solo infestado com *Meloidogyne javanica*. *In*: Congresso Latino Americano. *Anais*. Gramado, (2013).
- 27 Saba H. Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agente. *Mycosphere*, Guiyang, **3** (4):524-531 (2014).

- 28 Wohlenberg, M. D.; Antonioli, Z. I. *Supressão de Meloidogyne sp. por isolados de Trichoderma sp. na soja*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, RS (2018).
- 29 Zeilinger S et al. Secondary metabolism in Trichoderma - Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, **30** (2): 74-90 (2016).
- 30 Léo FJS, Sousa JA, Silva MR. Desempenho de cultivares de alface no Estado do Acre. *Horticultura Brasileira*. **18** (3): 225-228 (2000).
- 31 Charchar JM. *Métodos simplificados em Nematologia*. Brasília: Embrapa Hortaliças. Embrapa Hortaliças. (Circular Técnica nº 23) ps. 12 (2001).
- 32 Rodrigues CS, Pinheiro JB, Suinaga FA, Pereira RB, Carvalho ADF. Seleção preliminar de cultivares de alface para resistência ao nematoide-das-galhas. *Horticultura Brasileira* **30**: S2048-S2054 (2012).
- 33 Nazareno GG, *Utilização de matéria orgânica no controle de nematoide das galhas em alface sob cultivo protegido*. (Dissertação de Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília. ps. 75 (2009).
- 34 Coolen WA, D'Herde CJ. *A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue*. Ghent, Bélgica. State Nematology and Entomology Research Station, ps. 77 (1972).
- 35 Koopt Biological Systems. *Trichodermil*. <https://www.koopt.com.br/trichodermil/> [accessed 10 julho 2021].
- 36 Hortibras. *Semente de alface Ines 7,5MX – Sakata* (2021). <https://www.hortibras.com.br/sementes/alfaces/alface-lisa/semente-de-alface-ines-7-5mx-sakata>. [accessed 08 august 2021]
- 37 Taylor AL, Sasser JN. *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. Raleigh: International Meloidogyne Project, NCSU & USAID Coop. Publ., ps. 111 (1978).
- 38 Jenkins WR. A rapid centrifugal-otation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* **48**: 692 (1964).
- 39 Roland JC, Vian B. General preparation and staining of thin sections. In: Hall JL, Hawes C (eds) *Electron microscopy of plant cells*. Academic Press, London, pp 1–66 (1991).
- 40 O'Brien TP, Feder N, McCully ME. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/BF01248568> **59**: 368–373 (1964).
- 41 R Core Team, R: *A language and Environment for Statical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (2020).
- 42 Bartoń K. *MuMIn: Multi-Model Inference*. R package version 1.43.6. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>(2019).

- 43 Bozdogan, H. Model selection and Akaike's Information Criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrika*, <https://doi.org/10.1007/BF02294361> **52** (3), 345–370 (1987).
- 44 Wickham H. *ggplot2: An Implementation of the Grammar of Graphics*. R package version 0.8.7, URL <http://CRAN.R-project.org/package=ggplot2> (2010).
- 45 Mota FC. *Análise de fontes de resistência do algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3 e caracterização histopatológica da interação planta-nematoide*. Dissertações (Mestrado em Fitopatologia) Universidade de Brasília, Brasília, ps. 83 (2011).
- 46 Westerich JN, Rodella RA, Rosa JMO, Wilcken SRS, Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (=M. mayaguensis) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. *Summa Phytopathologica*, **38**(3): 192-197 (2012).
- 47 Westerich JN, *Estudos histopatológicos e ciclos biológicos de *Meloidogyne mayaguensis* e *M. javanica* em tomateiros com gene Mi*. Tese de Mestrado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista, 83 p (2010).
- 48 Chitwood DJ, Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agriculture Research Service. *Pest Management Science* **59**: 748-753 (2003).
- 49 Smiley R, *Plant parasitic nematodes affecting wheat yield in the pacific west*. Oregon State University Extension Services EM 8887, (2005).
- 50 Oliveira CD, *Exxertia de plantas de pimentão em *Capsicum spp.* no manejo de *Nematoides de galha**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, ps. 134 (2007).
- 51 Krzyzanowski AA, Ferraz LCCB, Effect of inoculation type and inoculum level of *Meloidogyne incognita* races 1 and 2 on the growth of lettuce cv. Baba under greenhouse conditions. *Summa-Phytopathologica*, Jaguariúna. **26**(2): 286-288(2000).
- 52 Asuaje L, Jimenez MA, Jimenez-Perez N, Crozzoli, R. Efecto del nematodo agallador, *Meloidogyne incognita*, sobre el creciahento de tres cultivares de lechuga. *Fitopatologia-Venezolana*.**17**(1): 2-5 (2004)
- 53 Oliveira CMG, Rosa JMO, *Nematoides parasitos da alface*. Prosaf. (2017). Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/prosaf/apostilas/nematoides_alface.pdf
- 54 Biondi CM, Prado MDC, Medeiros JE, Pedrosa EMR, Moura RM, Tolerância do coentro ao parasitismo do nematoide *Meloidogyne incognita* raça 1. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, **25**(2): 239-241, (2001).
- 55 Welter AM, *Avaliação de produtos para o controle de nematoide na cultura da soja*. (Tese Mestrado). Pelotas. Universidade Federal de Pelotas. ps. 30 (2015).
- 56 Pinheiro JB, Silva GO, Pereira RB, *Nematoides na Cultura da Batata*. 1. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica 143) ps.12 (2015).

- 59 Oliveira DC, Isaias RMS, Fernandes GW, Ferreira BG, Carneiro RGS, Fuzaro L Manipulation of host plant cells and tissues by gallinducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology* **84**:103-113 (2016).
- 58 Oliveira DC, Moreira ASF, Isaias R, Martin V, Rezende U. CSink status and photosynthetic rate of the leaflet galls induced by *Bystracoccus mataybae* (Eriococcidae) on *Matayba guianensis* (Sapindaceae). *Frontiers in plant Science* <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01249>. **8**: 1249 (2017).
- 60 Jovino RS, *Desenvolvimento de Coriandrum sativum cv.verdão sob diferentes níveis de infestação de Rotylenchulus sp.* Areia, PB, Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) ps. 32 (2018).
- 61 Santos JRM, Doenças da ervilha. In: Zambolim L, Vale FXR, Costa H (Ed.). *Controle de doenças de plantas: hortaliças*. Viçosa: UFV, **1**: 409-440 (2000).
- 62 Sharma RD, Silva JE, Resck DVS, Gomes AC, Dinâmica de população de fitonematoides em solo tratado com iodo de esgoto em cultivos de milho. *Nematologia Brasileira*, **24** (1): p.37-40 (2000).
- 63 Fiorini CVA, Gomes LAA, Maluf WR, Fiorini IVA, Duarte RPF, Licursi V, Avaliação de populações F2 de alface quanto à resistência aos nematoides das galhas e tolerância ao florescimento precoce. *Horticultura Brasileira*, **23**(2): 299-302 (2005). Crossref
- 64 Fiorini, CVA, Gomes, LAA, Libânio RA, Maluf WR, Campos VP, Licursi, V, Moretto P, Souza LA, Fiorini IVA, Identificação de famílias F2: 3 de alface homozigotas resistentes aos nematoides das galhas. *Horticultura Brasileira*, **25**(4): 509-513 (2007). Crossref
- 65 Carvalho Filho JLS, Gomes LAA, Silva RR, Ferreira S, Costa RR, Maluf WR. Parâmetros populacionais e correlação entre características da resistência a nematoides de galhas em alface. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. **6**(1): 46-51 (2011) ISSN: 1981-1160.
- 66 Mafessoni AB. Manejo biológico de *Meloidogyne* spp. no cultivo de tomate em ambiente protegido em solo autoclavado e contaminado. Tese (Doutorado em Produção vegetal). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista, *Bahia*, (2018).
- 67 Borges FG, Battistus AG, Müller MA, Mioranza TM, Kuhn OJ, Manejo alternativo de nematoides de galha (*Meloidogyne incognita*) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). *Scientia Agraria Paranaensis*, Mal. Cdo. Rondon, suplemento, dez., **12**: 425- 433 (2013).
- 68 Peixoto LA, Alves FR, Moraes WB, Belan LL, Quantificação de danos em alface causado por diferentes níveis de *Meloidogyne incognita* em diferentes tipos de solo. *Enciclopédia Biosfera*, **7**(12) (2011).
- 69 Assunção MC. *Levantamento de Meloidogyne spp. em áreas de cultivo de alface na região agreste do estado de Alagoas*. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo (2016).

Supplementary Material

A- Table 1. Multiple regression table using shoot fresh weight (SFW) as a response and treatments and plant development variables as predictors. SCD=stem/crown diameter; WAP= width of the aerial, RFW= root fresh weight, NLP = number of leaves (plant); gl= degrees of freedom.

Modelos	est	RL	SCD	WAP	RFW	NLP	Trat	CR:trat	NLP:trat	gl	AICc	delta	peso
120	49.75	0.98	1.56	4.56		7.47	+	+		10	803.1	0.00	0.16
1144	49.19	1.90	1.68	4.48		5.75	+	+	+	12	804.6	1.46	0.08
128	50.03	0.77	1.35	4.61	0.93	7.29	+	+		11	804.7	1.54	0.07
Nulo	53.23									2	914.8	111.64	0.00

B- Table 2. Multiple regression table using width of the aerial part (WAP), as response and treatments and plant development variables as predictors. RL=root length; SCD=stem/crown diameter; SFW= shoot fresh weight; RFW= root fresh weight; NL= number of leaves (plant); trat = treatment; gl= degrees of freedom

Model	est	RL	SCD	SFW	RFW	NL	Trat	SCD:trat	SFW:trat	Gl	AICc	delta	peso
62	32.27	-0.74		2.13	-0.52	-1.47	+			8	564.6	0.00	0.12
54	32.47	-1.04		2.08		-1.57	+			7	564.7	0.10	0.11
318	32.39	-0.85		2.57	-0.53	-1.42	+		+	10	565.4	0.74	0.08
310	32.61	-1.16		2.56		-1.52	+		+	9	565.6	0.93	0.07
56	32.57	-1.05	-0.23	2.12		-1.52	+			8	566.4	1.74	0.05
184	32.59	-1.01	-0.33	2.11		-1.51	+	+		10	566.5	1.81	0.05
Nulo	31.03									2	616.4	51.77	0.00

C- Table 3. Multiple regression table using number of leaves (plant) (NL) as response and treatments and plant development variables as predictors. RL=root length; SCD=stem/ crown diameter; WAP= width of the aerial part; SFW= shoot fresh weight; RFW= root fresh weight; trat= treatment; gl= degrees of freedom

Model	est	RL	SCD	WAP	SFW	RFW	trat	CR:trat	SFW:trat	gl	AICc	delta	Peso
1085	19.33			-0.91	2.09	1.24	+		+	9	489.7	0.000	0.171
1150	19.26	0.12		-0.89	2.10	1.16	+	+	+	12	491.3	1.591	0.077
1087	19.26		0.16	-0.91	2.04	1.18	+		+	10	491.5	1.798	0.069
126	19.03	0.41		-0.89	2.12	0.45	+	+		10	491.6	1.866	0.067
Nulo	18.80									2	588.2	98.471	0.000

D- Table 4. Multiple regression table using root fresh weight (RFW) as response and treatments and plant development variables as predictors. RL=root length; SCD=stem/crown diameter; SFW= shoot fresh weight; NL=number of leaves (plant); trat= treatment; gl= degrees of freedom.

Model	est	RL	SCD	NL	trat	RL:trat	SCD:trat	NL:trat	gl	AICc	delta	peso
244	11.20	1.14	0.98	0.93	+	+	+		11	598.8	0.00	0.19
116	11.18	1.13	1.05	0.93	+	+			9	599.4	0.64	0.14
1268	11.57	0.76	0.59	1.75	+	+	+	+	13	600.5	1.70	0.08
Nulo	12.63								2	694.5	95.74	0.00

**ARTIGO 3 – HOW THE ROOT-KNOT NEMATODE *Meloidogyne incognita*
AFFECTS THE DEVELOPMENT AND ANATOMICAL STRUCTURE AND
PARSLEY *Petroselinum crispum* (MILL.)?**

(VERSÃO PRELIMINAR)
NORMAS DO PERIÓDICO PROTOPLASMA

How the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* affects the development and anatomical structure and parsley *Petroselinum crispum* (Mill.)?

Roberta Mendes Isaac Ferreira Vilela, Vinícius Coelho Kuster, Vitor Campana Martini, Renato Marques Oliveira and Denis Coelho de Oliveira.

Abstract

Infection by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* impacts crop productivity worldwide, including parsley (*Petroselinum crispum*). This infection goes through a complex relationship between the pathogen and the tissues of the host plant, leading to the formation of galls and feeding sites that disorganize the vascular system, affecting the development of cultures. In this work, we sought to evaluate the impact of parasitism on the agronomic characteristics of parsley, on the development of galls and feeding sites and how this development impacts the anatomical structure of the root. In addition, we evaluated the dynamics of cell wall composition during the formation of feeding sites (giant cells). Parsley was inoculated with 5,000 juvenis (J2) of *M. incognita* and root fragments were removed at 04, 11, 18, 25, 32, 39, 46, 54 and 66 DAI, and the agronomic characteristics were evaluated at 66 DAI (Days After Inoculation). *M. incognita* affected the development of agronomic characteristics of parsley, which showed lower root weight and lower shoot weight and height. The formation of giant cells was noticed at 18 DAI, with a number of giant cells sufficient to nourish the female nematode. Small, spherical galls were also noted at 18 DAI, both of which disorganize the vascular tissue of the root. There were distinct responses in the detection of polysaccharides from the cell wall of the giant cells at two different times in the inoculated root and in the control root, in which homogalacturonans were more frequently marked in the later phase of the inoculated roots, which may be related to the formation of galls and flexibility of the roots. Giant cells thus contributing to the nutrition of the nematode.

Keywords: Nematode. Parsley. Production. Galls. Anatomy. Immunocytochemistry.

1 Introduction

The formation of galls on roots is one of the first symptoms of the establishment of the galling nematode. These galls are formed by the hypertrophy of the parenchyma cells in the cortex (Grossi de Sá 2011; Vilela et al. 2019; 2021) and appear soon after *Meloidogyne* spp. nematodes penetrate and infect the roots of the host plants (Pinheiro 2016). In the juvenile stage (the second stage, J2), the nematodes move to the adjacent cells of the vascular system, until the zone of protoxylem development, where they establish and start to modify structurally the cells (Grossi de Sá 2011). Through the secretion produced by their esophageal glands, the parasites trigger a process of hypertrophy and hyperplasia of the cells of vascular system, which leads to the formation of giant cells (Vilela et al. 2021). As these giant cells increase in size they provide the nematode with food, becoming a feeding site (Taylor e Sasser 1983; Zhao et al. 2000; Moens et al. 2009). After they are adult and sedentary, females produce an egg mass and close the cycle (Pinheiro and Pereira 2016). These eggs (500 to 1000) are surrounded by a gelatinous matrix and are usually located in the cortical parenchyma or on the surface of the roots (Pinheiro 2012).

Giant cells are one of the most complex responses occurring in plant tissues by the action of a pathogen (Huang 2005). These cells are multinucleated, with dense cytoplasm and thick invaginated cell walls (Vilela et al. 2019). The cell wall may undergo a process of thickening and loosening that allows expansion and, thus, favors the absorption of nutrients by the parasite (Bohlmann and Sobczak 2014; Escobar et al. 2015). In galls induced by *Meloidogyne incognita* (Heteroderidae) in okra (*Abelmoschus esculentus*, Malvaceae), changes in the degree of methyl-esterification of homogalacturonans (HGs) in the cell wall of xylem parenchyma cells were essential for their elongation, gain in porosity and, consequently, the formation of the giant cells (Vilela et al. 2021). Thus, understanding the processes that lead to changes in the dynamics of cell wall components during the nematode-host plant interaction can be configured as important tools in the proposition of infection control.

The plant cell wall consists mainly of cellulose, hemicelluloses and pectins (Albersheim et al. 2011; Wilson et al., 2015) and protects the plant against the attack of pathogens, such as *M. incognita*, by activating defense mechanisms in the host plant (Holbein et al., 2016). Among the wall compounds, pectins are complex structural polysaccharides generally involved in cell adhesion, rigidity, and porosity (Albersheim et al., 2011), and are divided into main groups: homogalacturonans (HGs), rhamnogalacturonans I (RG-I) and

rhamnogalacturonans II (RGII), xylogalacturonans (XGA) e apiogalacturonans (AP) (Mohnen, 2008; Keegstra, 2010, Albersheim et al. 2011). Hemicelluloses are fibrillar polysaccharides composed mainly of hexoses or pentose units, which form xyloglucans, heteromannans, heteroxylans, among other types (Pauly et al, 2013). These compounds interact with cellulose microfibrils and form a cellulose-hemicellulose network that becomes established in the pectic matrix of the cell wall, acting in wall stabilization, rigidity, or even as a reserve compound. (Scheller and Ulvskov, 2010). Nematode galls on roots can cause a remobilization of non-cellulosic cell wall compounds previously set in the host organ, changing the cellular and functional structures during the formation of the cells that will compose the galls (Vilela et al. 2021). Galls are the main symptom of the root-knot nematode, which is present in several crops such as parsley *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym (Apiaceae).

A parsley is a spice plant widely used for its flavor and aroma (Salla et al. 2019; Proz 2020), and its medicinal properties (Cătuşescu et al. 2017). It is also an important source of income for family farmers who supply supermarkets, grocery stores, fairs, and restaurants with fresh plants (Carvalho 2010). This herb is susceptible to infections by root-knot nematodes, particularly *M. incognita* (Kofoid and White 1929; Pinheiro 2016), a globally distributed parasite common in vegetable crops and responsible for severe production losses (Moens et al. 2009). Such pathogens make certain agricultural goods unviable for commercialization and consumption by damaging their root system, which can lead to productivity losses reaching up to 100% (Rosa et al. 2013; Pinheiro et al. 2014; 2017; Silva et al. 2016). Losses depend on infestation levels and plant species (Pinheiro et al. 2017), as it reduces the absorption of water and nutrients from the soil (Tihohod 2000; Asmus 2001; Gomes et al. 2008). Also, the intensive cultivation of species of the Apiaceae in the same area, under certain climatic conditions, can lead to an increase in the population of galling nematodes with a life cycle between 21 and 45 days (Pinheiro; Ferreira; Pereira 2012).

The present study seeks to evaluate the impact of infestation by *Meloidogyne incognita* on the roots of parsley *Petroselinum crispum* Mill. To do that, we intend to answer the following questions: (i) does the infestation of the nematode *M. incognita* affect agronomical traits of parsley? (ii) What are the histological changes triggered by the induction of galls on parsley roots throughout its development? (iii) What are the pectic and hemicellulose compounds remobilized in the parsley root cell wall to form galls and giant cells? We hypothesize that gall formation will reduce shoot production, which impacts plant productivity, as well as disorganize the vascular cylinder of the root, as it is the site of gall

induction. Furthermore, we believe that changes in the degree of methyl-esterification of HGs in the cell wall of root cells will allow for cell hypertrophy during gall formation, which includes giant cells.

2 Material and methods

The experiment was carried out in a greenhouse at UniCerrado University Center, municipality of Goiatuba. (18° 00' 45" S, 49° 21' 17" W), Goiás state, Brazil. The variety of parsley used was (Da Roça) Horticides Seeds®, which has flat leaf, was chosen because it is one of the favorites in Brazil for its flavor and aroma in Brazil (Lana 2021).

In December 2020, seeds were sown into 100-cell plastic trays containing Bioplant® (Sphagnum peat, coconut fiber, rice husk, pine bark, vermiculite and nutrients) substrate for seedling cultivation. After 20 days of seedling emergence, the seedlings were transplanted to 2.8 L pots with the substrate in a 1:1 proportion of sand and dystrophic red latosol soil. We chose this substrate based on the preference of *Meloidogyne* spp. for sandy soils (Starr 1998; Asmus 2004; Asmus et al. 2015). The mixture of sand and soil had been sterilized in an autoclave at 120 °C for 1 h. Six days after transplantation, nematodes were inoculated into two holes close to the roots by pipetting 2 mL of a solution containing a suspension of 5,000 juveniles (J2) of *M. incognita*. The nematodes used as inoculum in this study had been previously identified, multiplied in *Solanum gilo* due to its susceptibility to this parasite, and extracted from the root galls by the method of Coolen and D'Herde (1972, modified). We conducted two treatments: (i) control treatment, where 50 individuals of parsley grew without *M. incognita*; and (ii) inoculum treatment, where 50 parsley individuals were exposed to juveniles (J2) of *M. incognita* early in their development. The design consisted of randomized blocks, with 10 replications per treatment and five pots per plot.

2.1 Agronomic traits and galls

The flat leaf parsley (cv. Da Roça) has a cycle ranging between 54 and 75 days (Guidoni 2011) and, in our experiment the plants were removed from the pots 66 days after inoculation (DAI). After the parsley development period, the plants of both treatments were carefully removed from the soil and had their roots washed and placed on an absorbent paper surface for excess moisture removal. The aerial part was collected simultaneously. Agronomic traits were then evaluated based on the following parameters: (i) root fresh weight (g); (ii)

shoot fresh weight, both weighed on a Balmak ELP-10 analytical balance; (iii) shoot height, (iv) root length, with measurements taken between the plant neck and the tip of the terminal bud of the main branch; (v) root dry weight; (vi) shoot dry weight, after drying in an oven for 72 hours, and (vii) number of root galls.

The resistance of parsley to the root-knot nematode was evaluated according to the number of galls in the root, which was used to obtain the gall index (GI), proposed by Taylor and Sasser (1978). This classification ranks the plants in 0-5 scale: 0 = no galls; 1 = 1-2 galls; 2 = 3-10 galls; 3 = 11-30 galls; 4 = 31-100 galls and 5 = more than 100 galls. Thus, parsley will be considered resistant if the plants have 0 to 10 galls (scales 0-2) or susceptible if the plants have 11 or more galls (3-5).

2.2 Morphological and anatomical analyses

Roots of uninoculated plants were collected in median portions of the organ 4 days after non-inoculation (DNI), while galls present in the median and apical regions of the roots were collected on different days after inoculation (04, 11, 18, 25, 32, 39, 46, 54 and 66 DAI). All plant fragments were fixed in FAA50 (formaldehyde + acetic acid + 50% ethanol 1:1:18) and subsequently stored in 70% alcohol (Kraus & Arduin 1997). We measured thenon-galled roots and the galls from the different DAI with a digital caliper and photographed them with a stereoscopic microscope (Leica® EZ4 HD).

For anatomical characterization, the plant fragments were dehydrated in an ethanol series and embedded in 2-hydroxyethyl methacrylate (Historesin, Leica® Instruments, Germany), and then sectioned on a rotating microtome (YD-315 model, China) at 6 µm thick. Sections were stained with toluidine blue at 1%, pH 4.0 (O'Brian and Feder 1968) and mounted with Entellan®. The slides were photographed with a Leica® DM500 photomicroscope and coupled with a Leica® ICC50HD camera.

2.3 Immunocytochemical analyses

The immunocytochemical analyzes were performed at 66 DNI for the control, and at 25 and 66 DAI for the treatments. These stages were chosen to compare the composition of the cell wall in a healthy root and in the initial and final stages of giant cells development.

Samples subjected to monoclonal antibodies for hemicellulose detection were pre-incubated with 10 µg mL⁻¹ of pectate lyase (Sigma-Aldrich) in 2 mM of CaCl₂ buffer, 50 mM

of 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS) (Sigma-Aldrich, USA), pH 10 (Marcus et al., 2008), for 2 h. After this pre-treatment, the sections selected for the detection of hemicelluloses were immersed in a blocking solution of Molico[®] powdered milk/phosphate buffer saline (PBS) during 30 minutes. The samples were then incubated for 2 h in the monoclonal primary antibodies JIM5, JIM7, LM5, LM6, LM11, LM15 and LM21 (Appendix 1) (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) (Table 1), diluted 1:10 in milk/PBS. After incubation, sections were washed in PBS and again incubated in the secondary antibody FITC (1:100 in 3% milk/PBS), for 2 hours in the dark. Control was obtained by suppressing incubation with the primary antibodies.

The slides were mounted in 50% glycerin, and the reactions were observed through a fluorescence microscope (DM4000 LED, Leica[®] Instruments, Germany) coupled with a monochromatic HD camera (DFC3000 G). Excitation wavelengths of 450–490 nm and an emission filter of 515 nm were used. DAPI filter was used for autofluorescence labeling. Thus, positive (+) results were marked with green staining, and negative (-) results with blue.

2.4 Statistical analyses

The collected data were submitted to an ANOVA to assess the difference among treatments. To test the effect of the number of galls on agronomic traits, simple linear regressions were performed using the traits of economic interest (root fresh weight; shoot fresh weight; root length; and root dry weight) as a response variable and the number of galls as a predictor. When necessary, data were transformed to meet the assumptions of homoscedasticity and normality. Analyses were performed using the R statistical program (R Core Team 2020). The graphs were made using the “ggplot2” package (Wickham 2010).

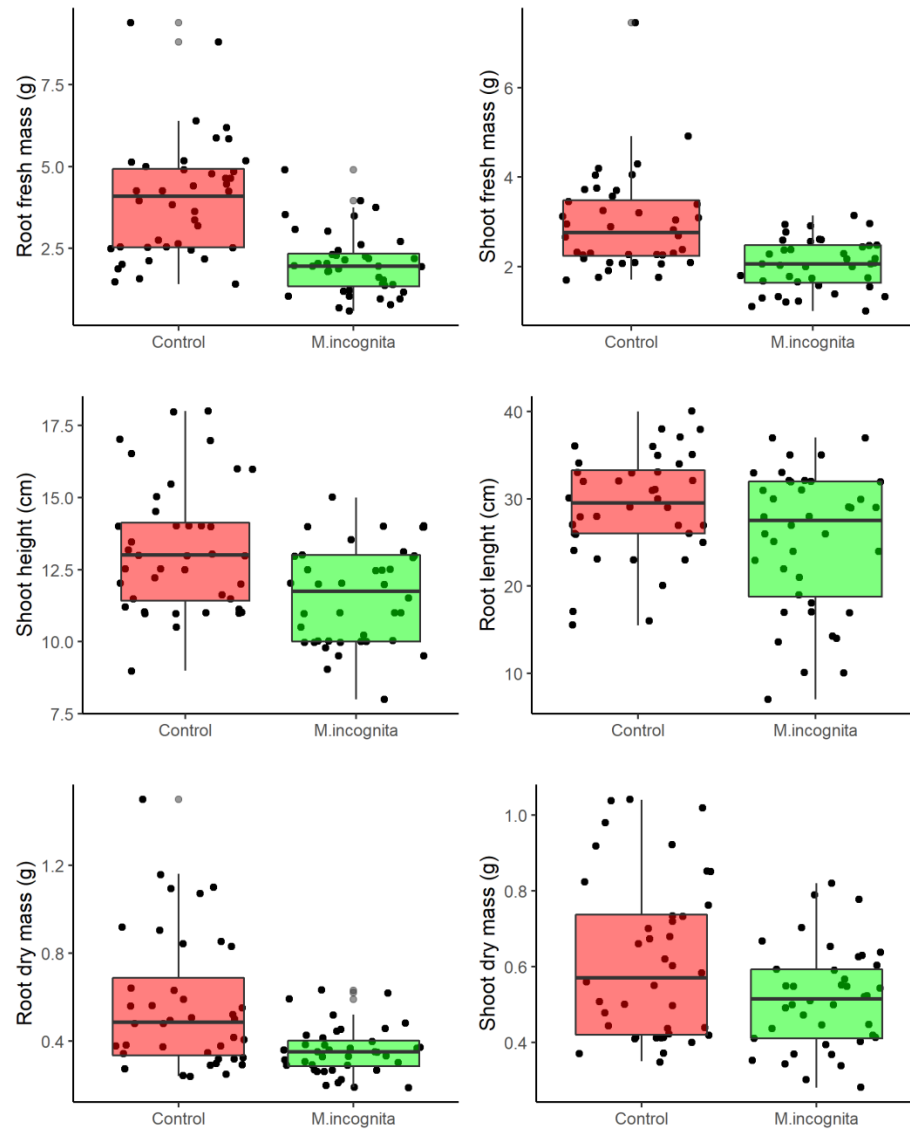
3 Results

3.1 Agronomic traits

At 66 DAI we verified that parsley inoculated with *M. incognita* had lower root fresh weight ($F_{1,78} = 35.7$; $p < 0.001$), shoot fresh weight ($F_{1,78} = 22.1$; $p < 0.001$), shoot height ($F_{1,78} = 13.4$; $p < 0.001$), root length ($F_{1,78} = 6.1$; $p < 0.05$), root dry weight ($F_{1,78} = 17$; $p < 0.001$) and shoot dry weight ($F_{1,78} = 6.5$; $p < 0.05$) compared to the uninoculated group at 66

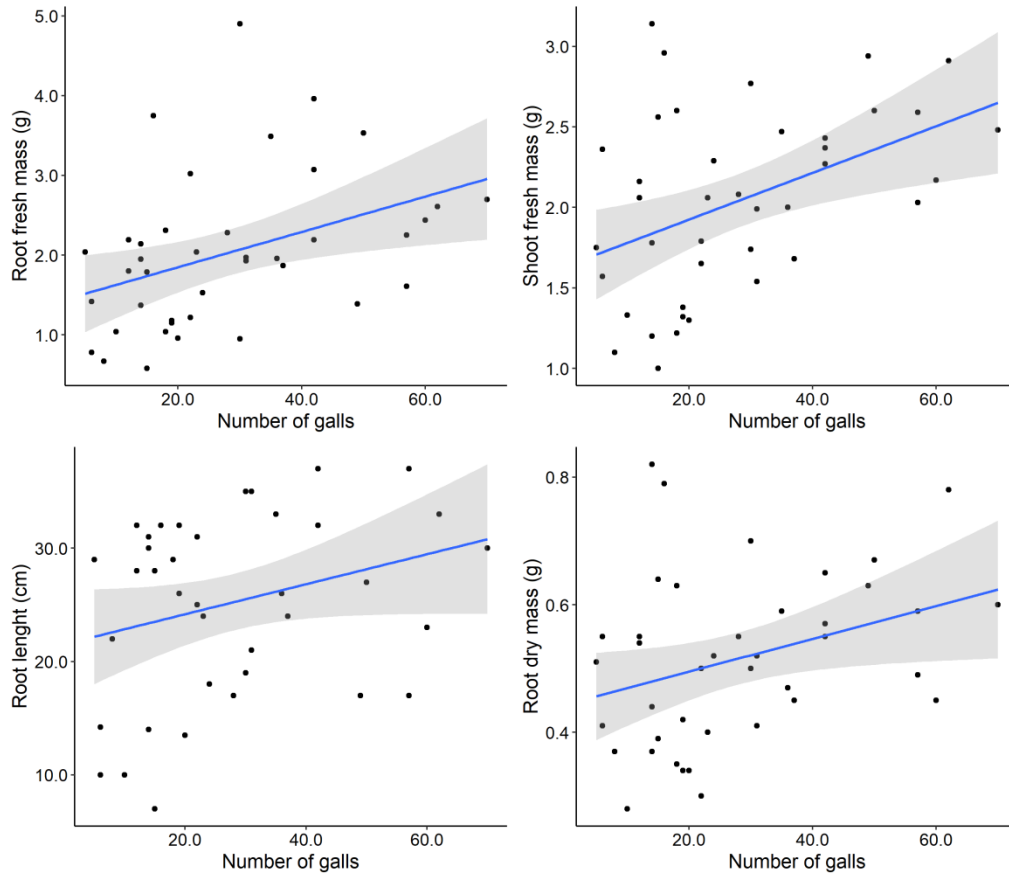
DNI (Fig. 1). The number of galls found (28) ranked the flat leaf parsley (Da Roça) at Grade 3 (11-30) susceptibility to *M. incognita*, following the scale by Taylor and Sasser (1978).

Figure 1. Agronomic trait means of flat leaf parsley (Da Roça) uninoculated (control) and inoculated with *Meloidogyne incognita* using the variables A- root dry weight; B- shoot fresh weight; C- shoot height; D- root length; E- root dry weight; F- shoot dry weight. Red = Uninoculated plant (control); Green = Plant inoculated with the nematode *M. incognita*.



Regarding the number of galls, despite the plants infested with the nematode being smaller, the plants that reached a larger size also harbored more galls. There was a positive relationship between root fresh weight (est = 0.02; $p < 0.05$), shoot fresh weight (est = 0.01; $p < 0.01$), root length (est = 0.005; $p < 0.01$) and root dry weight (est = 0.002; $p < 0.05$) with the number of galls per individual (Fig. 2).

Figure 2. Relationship between the number of galls and agronomic traits of parsley (Da Roça) inoculated with *Meloidogyne incognita*. Root and shoot fresh weight, root length, root dry weight.

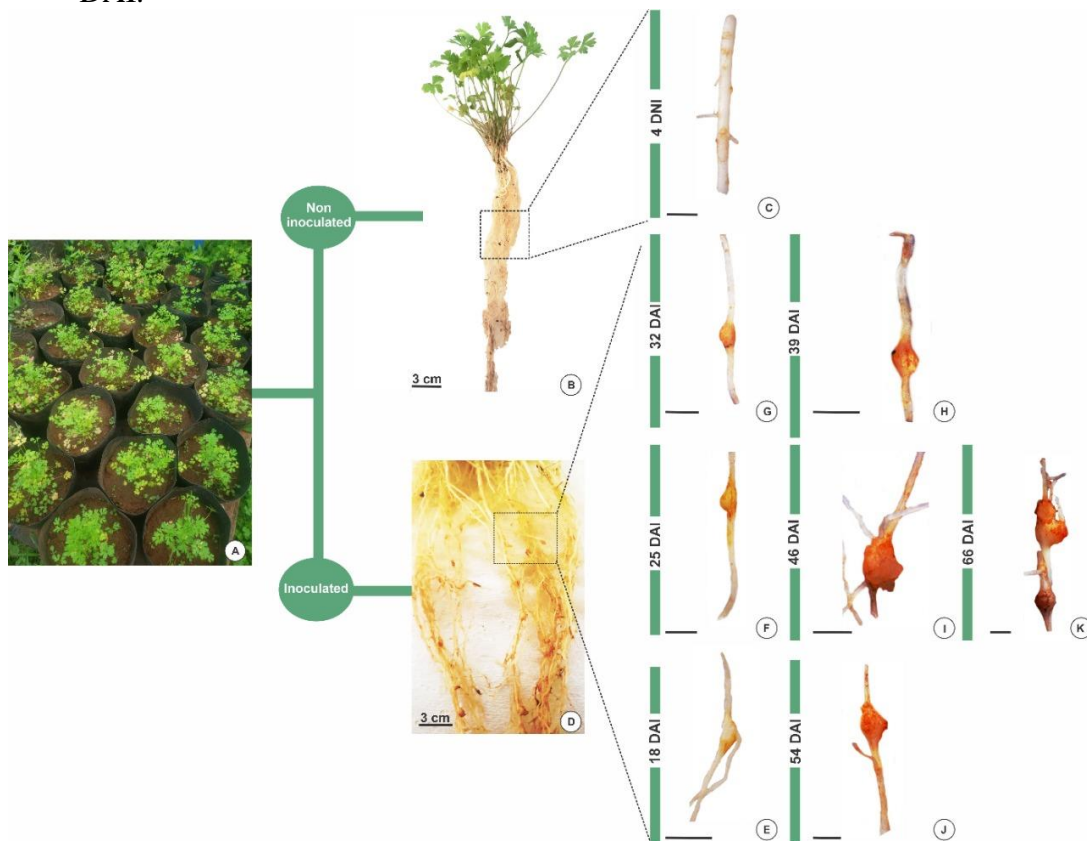


3.2 Gall morphology

The uninoculated root showed the usual structural development for the culture (Fig. 3B) without protuberances (Fig. 3C) at 4 DNI. The roots of plants inoculated with *M. incognita* presented galls (Fig. 3D). No lateral thickening of the root was detected at 4 and 11 DAI, the formation of galls started being noticeable only at 18 DAI (Fig. 3E).

An increase in the gall size was visible at 25 and 32 DAI (Fig. 3F, G), and 39 DAI galls had kept growing and become more spherical (Fig. 3H). Then, at 46 DAI (Figure 3I) the galls had assumed an irregular shape, and an egg mass visible to the naked eye was present on their surface. The egg mass was also noticeable 54 and 66 DAI (Fig. 3J, 3K), when the galls were more numerous.

Figure 3. Morphological traits of parsley and its galls induced by *Meloidogyne incognita*. A- Flat leaf parsley (Da Roça), the variety used in the experiment; B- Aerial and root system of the uninoculated plants; C- Root 4 days after inoculation (DAI) showing no sign of lateral thickening; D- Presence of galls on the inoculated root; E- Appearance of galls 18 DAI; F, G- Small spherical galls 25 and 32 DAI; H- Larger and spherical galls 39 DAI; I- Larger and irregularly conformed galls with the presence of a eggs mass 46 DAI; J- Gall 54 DAI; K- Galls in a greater quantity 66 DAI.



3.3 Anatomical traits

Four days after non-inoculation, the root presented a uniseriate epidermis, vascular cylinder with diarch xylem (2 poles of the protoxylem) and a cortex with 5 to 7 layers of parenchyma cells (Fig. 4A). Later, at 66 DNI (Fig. 4B), the epidermis was replaced by a periderm while the cortex presented a greater number of layers. The vascular cylinder remained with primary xylem and phloem, and xylem was tetrarch in some roots (Fig. 4B).

No protuberances were observed on roots inoculated with *M. incognita* at 4 and 11 DAI, with galls being anatomically detected only 18 DAI (Fig. 4C). On the 18th DAI the epidermis was uniseriate with a parenchymal cortex, and the vascular cylinder with a few small giant cells (Fig. 4C). Then, 25 DAI the number and size of giant cells had increased

(Fig. 4D), and cell divisions had begun in the cortical parenchyma (Fig. 4D). Giant cells presented a thick multinucleated cell wall, with a clear disorganization of the vascular system (Fig. 4D). At this stage, the female of *M. incognita* is an adult and has a globose shape, remaining in direct contact with the giant cells (Fig. 4E), something similar to that found 32 DAI (Fig. 4F).

A large number of nourishing/giant cells was observed at 39 DAI (Fig. 4G), as well as the first appearance of the egg mass (Fig. 4H). The giant cells reached their greatest extent and quantity in the later stages, 46 DAI (Fig. 4I), 54 DAI (Fig. 4J) and 66 DAI (Fig. 4K, L), causing greater disorganization of the vascular system. After multiplication of cortical parenchyma cells in previous stages, the parenchyma occupied a large proportion of the gall. The appearance of the periderm was observed at 66 DAI (Fig. 4K).

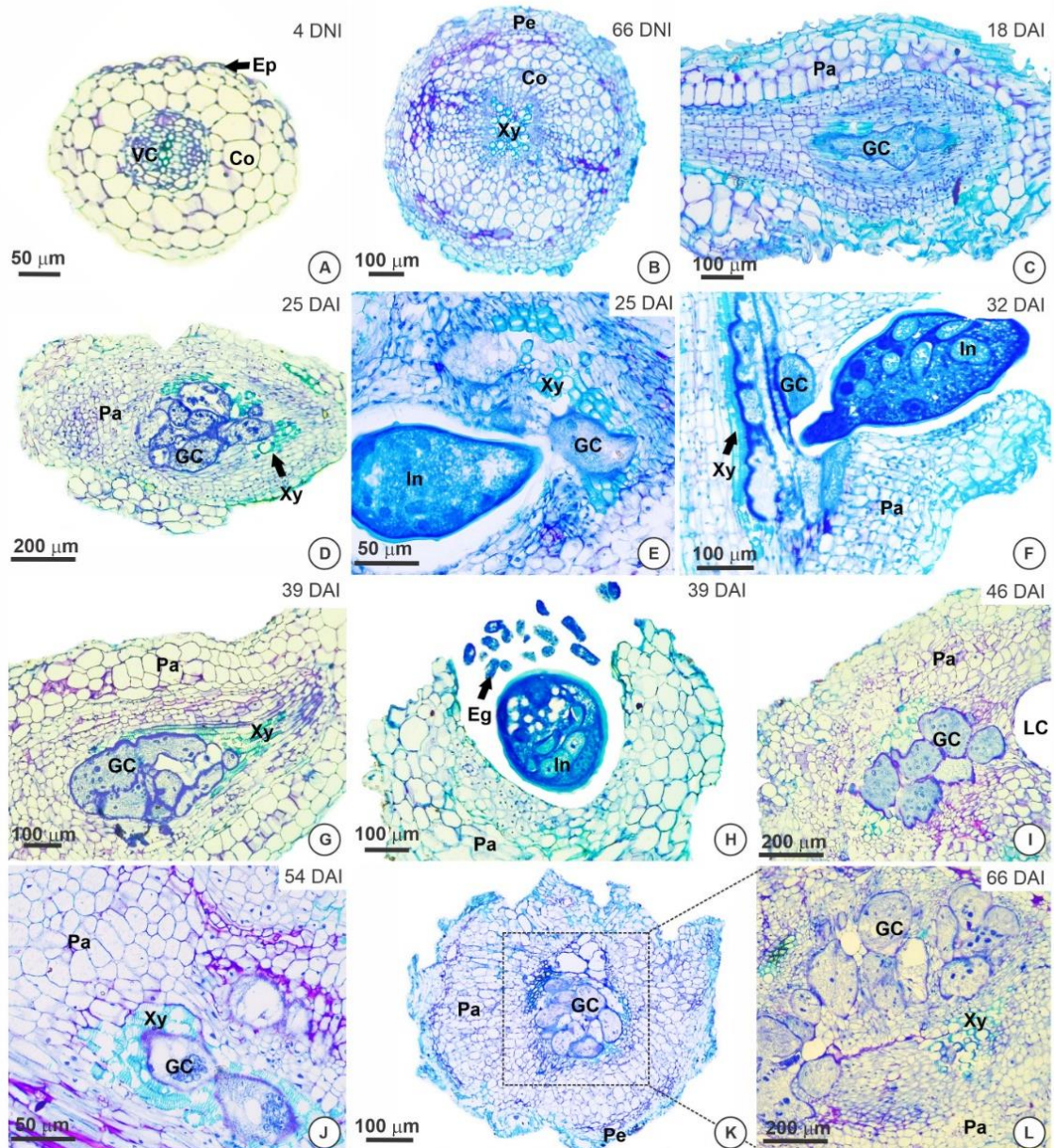
3.4 Immunocytochemistry analysis of cell wall

The monoclonal antibodies detected the distinct types of hemicelluloses and pectins between inoculated and uninoculated roots at 66 DNI and 66 DAI, as well as between roots inoculated in the earliest stage of giant cells (25 DAI), such as shown in Table 2.

Epitopes of methyl-esterified HGs, recognized by the JIM7 antibody, were marked in the cortex, xylem parenchyma cells, and phloem at 66 DNI (Fig. 5A; Table 1) and 66 DAI, as well as in giant cells (Fig. 5B; Table 1). Prior to that, at 25 DAI, only the cell walls in the cortex parenchyma were marked (Table 1). Epitopes of HGs with low methyl-esterification, recognized by JIM5, were less present at 66 DNI and 25 DAI, occurring in the cortex and periderm, respectively (Table 1). Later, at 66 DAI, only the xylem vessel elements were not marked (Fig. 5C, D; Table 1). Epitopes of (1→4) β-D-galactan, recognized by LM5, were detected in the same cells and tissues in the three stages, occurring in the cortex, xylem parenchyma cells, and phloem (Fig. 3E- I; Table 1). Epitopes of (1→5) α-L-arabinans, recognized by LM6 and epitopes of (1→4)-β-D-xylan / arabinoxylan, recognized by LM11, were not detected (Table 1).

Heteromannan epitopes, recognized by LM21, occurred only in the periderm 66 DNI (Fig. 6A; Table 1) and in the cortex and giant cells at 66 DAI (Fig. 6B; Table 1). Xyloglucan epitopes were marked by LM15 in the cortex, xylem parenchyma cells, and phloem at 66 DNI (Fig. 6C; Table 1). This epitope was widely marked at 66 DAI, not occurring only in the periderm (Fig. 6D; Table 1).

Figure 4. Anatomical traits of roots uninoculated (A and B) and inoculated (C-L) with *Meloidogyne incognita*. A- Uninoculated root 4 days after non-inoculation (DNI); B- Uninoculated root 66 DNI; C- Few Giant cells 18 days after inoculation (DAI); D- Well-formed feeding site 25 DAI; E, F- Presence of the female of *M. incognita* in contact with the giant cells; G- Numerous giant cells 39 DAI; H- Presence of inductor and egg mass; I, J- Giant cells 46 and 54 DAI; K, L- Presence of more feeding sites, and high disorganization of the vascular system.



Abbreviations: Co= Cortex; GC= Giant cell, Ep- Epidermis; Eg- Egg mass of female nematode; LC- Larval chamber (female chamber); Pe- Peridermis; In- inductor (nematode); Pa- Parenchyma; Xy- Xylem; VC- Vascular cylinder.

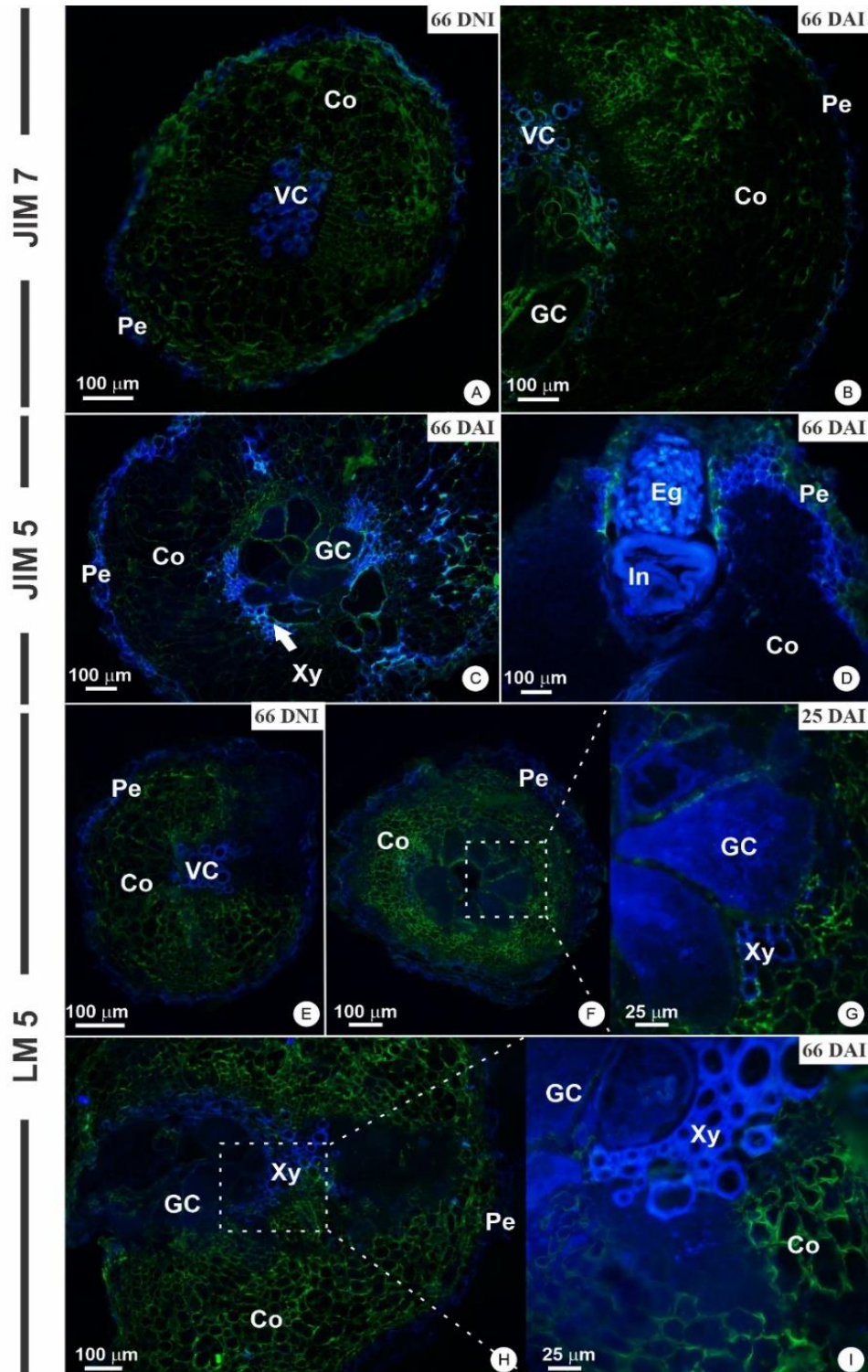
Table 1. Positive and negative immunofluorescence results in the roots of flat leaf parsley (Da Roça) uninoculated (66 DNI) and inoculated (25 DAI and 66 DAI) with *Meloidogyne incognita*.

Monoclonal Antibodies	66 DNI				25 DAI				66 DAI								
	Pe	Co	Xy		Ph	Pe	Co	Xy		Ph	GC	Pe	Co	Xy		Ph	GC
			PC	Ve				PC	Ve					PC	Ve		
JIM7	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
JIM5	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
LM5	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
LM6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LM11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LM21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
LM15	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Abbreviations: Pe- Periderm; Co- Cortical parenchyma; Xy- Xylem; PC- Parenchymal cell of xylem; VE- Vessel element; Ph- Phloem; GC- Giant cell.

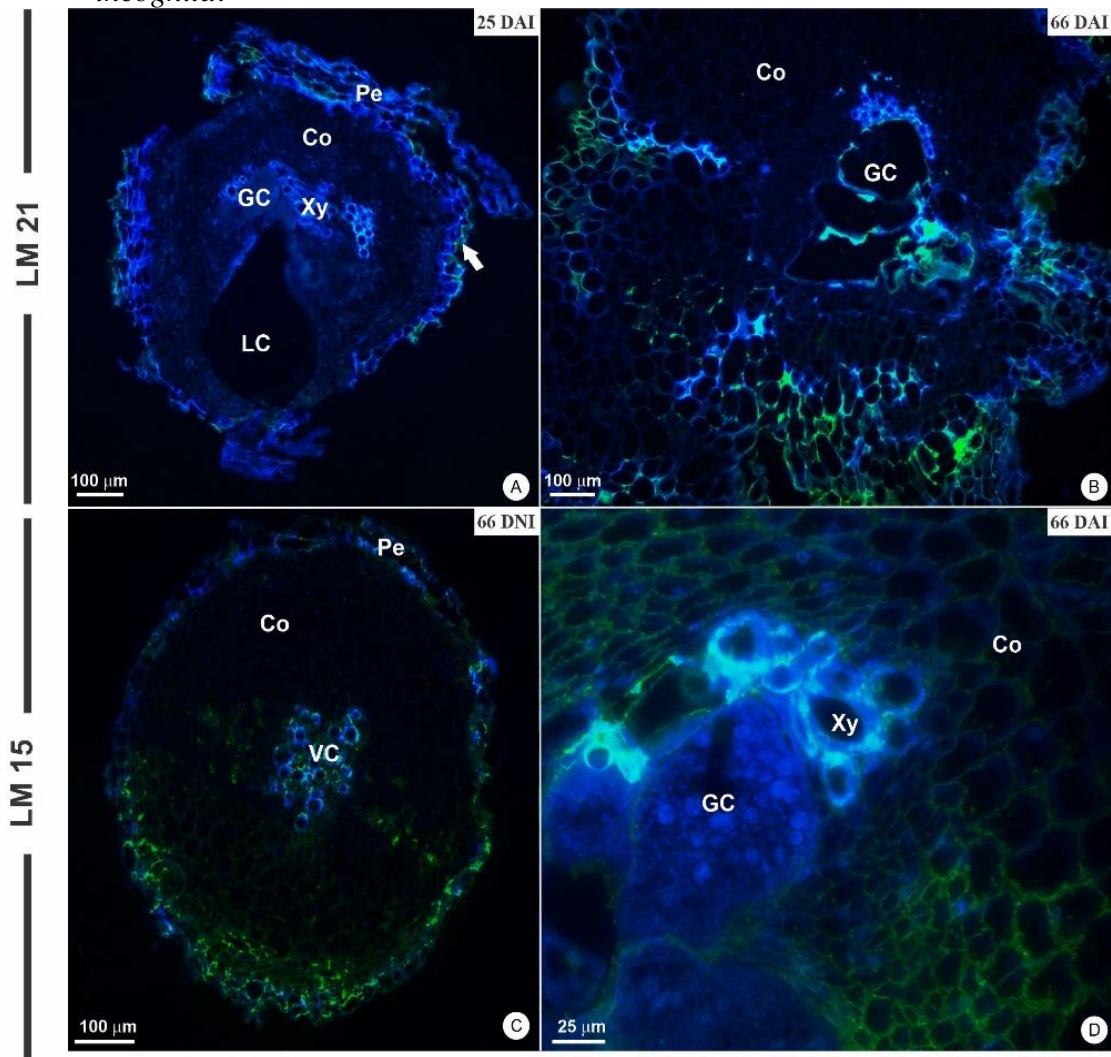
* Results: (-) Negative; (+) Positive.

Figure 5. Distribution of homogalacturonans, marked by JIM7 and JIM5, and rhamnogalacturonans, marked by LM5, in roots parsley (Da Roça), uninoculated (66 DNI) and inoculated (25 and 66 DAI) with *Meloidogyne incognita*.



Note: Single arrows show the positive result. *Abbreviations:* Co- Cortex; Pe- Periderm; VC- Vascular cylinder; GC- Giant cells; Xy- Xylem; Eg- Eggs; In- Inductor.

Figure 6. Distribution of hemicellulose epitopes, marked by LM21 and LM15, in roots uninoculated (66 DNI) and inoculated (25 and 66 DAI) with *Meloidogyne incognita*.



Note: Single arrows show the positive result. *Abbreviations:* Co- Cortex; LC- Larval chamber (female chamber); Pe- Periderm; VC- Vascular cylinder; GC- Giant cells; Xy- Xylem.

4 Discussion

4.1 Impacts of *M. incognita* induced galls on agronomical traits

Parsley reaches a shortheight before flowering, and the common flat leaf variety can reach up to 25 cm (Oliveira 2016), but the average reached in this study was between 10 to 13 cm. There was a difference between uninoculated plants and those inoculated with *M. incognita*, with the latter showing less root and shoot development. The root-knot nematode is one of the main soil limiting factors for plant production (Hallmann and Meressa, 2018) and when plants are parasitized, they might exhibit lower vigor and shoot development (Silva et al.

2006). In the tomato crops, root-knot nematode parasitism can reduce the yield (Pinheiro et al. 2014). In parsley infected by *M. arenaria*, as the population density of the parasites increased, the fresh weight of leaves decreased (Lozada-Villanueva, 2021). Reduction in plant height in the presence of high *Meloidogyne* densities was too reported by Aguirre et al., (2002). Reduction in shoot height and dry weight also occurred in tomato plants parasitized by *M. incognita* (Bordin 2002), and in rice (*Oryza sativa*), in which the root-knot nematode reduced shoot and root fresh weight in 11.1% and 21.85%, respectively, when compared to uninoculated plants (Neuschrank 2019).

In the present study, *M. incognita* impaired plant development, leading to lower fresh and dry weight and shorter shoot height. A decline in these agronomic traits combined with dwarfism, yellowing of the leaves, and a reduced branch growth would economically harm farmers (Sikora and Fernandez 2005; Souza 2018), as the aerial part is the commercialized part of parsley. Such scenarios are generally associated with the presence of galls on the root and a decrease in the root system (Sasanelli et al. 2015; Hallmann and Meressa 2018; Ntalli et al., 2019). *M. incognita* infection has significantly reduced plant height, stem circumference, plant fresh weight, and number and weight of roots in cassava (*Manihot esculenta*) (Akinsanya, 2020).

We further observed that the root-knot nematode infestation negatively affected the fresh and dry weight and root length of parsley, being lighter and shorter in relation to uninoculated roots. Root compromise has been reported in some crops such as rice, which can be severely affected by *Meloidogyne* spp. due to its noxious action on the root system (Bridge et al. 2005). In sweet potato (*Ipomoea batatas*), there has been reduction in the yield and quality of its tuberous roots (Pinheiro et al. 2011). Plants infected by nematodes of the genus *Meloidogyne* may have shorter roots, which are less efficient in absorbing water and nutrients, causing decreased growth and reduced productivity because of deformation and root under development (Taylor and Sasser 1983). Combined with the formation of tumors throughout the root system, these symptoms result in lower shoot development, generalized leaf chlorosis, reduced productivity and may lead to plant death (Moura 1997; Tihohod 2000; Vale et al. 2013). The severity of the damage caused by nematodes depends on factors related to parasite density and root weight (Pinheiro 2014), in addition to susceptibility of the genotype planted, and the season (Silva and Santos 2007).

One of the main symptoms caused by the presence of the *Meloidogyne* nematode is the formation of galls (Souza and Maximiano 2018) and flat-leaf parsley was considered susceptible to the parasites, classified in Grade 3 of the scale by Taylor and Sasser (1978).

Two other varieties, the ‘common parsley’ and the ‘giant Portuguese parsley’, had similar gall rates when parasitized by *M. enterolobii*, 2.8 and 3.7 respectively (Rosa et al. 2015). In 22 genotypes of okra (*Abelmoschus esculentus*) plants inoculated with *M. incognita*, the gall index ranged between grades 2 and 5 (Martinello 2001), and the same variation was found in carrot *Daucus carota* cultivars infested with *M. incognita* breed 1 and *M. mayaguensis* (Pinheiro; Carvalho; Vieira 2010). Hence, the susceptibility to this parasite can vary among plant species, eventually even within the same species, and also depending on the *Meloidogyne* nematode species involved.

Although not essential for the nematode to develop, galls help the producer to diagnose the infection and select more resistant genotypes, and even though it is not a rule, there may be a correlation between number of galls and nematode multiplication (Hussey and Janssen 2002). We found a positive correlation between the analyzed agronomic variables and the number of galls per individual, and the inoculated plants that were heavier, taller, and with longer roots hosted more galls. In pigeon pea (*Cajanus cajan*) parasitized by *M. enterolobii*, taller and heavier plants but with lower root weight had the greatest number of galls and the highest pathogen reproduction factor (Moreira et al. 2018), while in the okra inoculated with *M. incognita*, the inoculated plants obtained greater shoot height in relation to the uninoculated plants (Vilela et al. 2019), so in that particular case the root-knot nematode did not interfere with crop development.

4.2 Gall morphology induced by *M. incognita*

The female individuals *Meloidogyne* induce hyperplasia of the parenchyma cells in the cortex and vascular cylinder, simultaneously with the process of cellular hypertrophy, thus causing a thickening called root gall to develop in the root. In this study, galls were found from 18 DAI onwards, still small, and spherical in shape. However, in okra infested by *M. incognita* (Vilela et al. 2021) and in soybean parasitized by *M. javanica* (Vilela et al. 2019) small protuberances were noticed earlier, at 11 DAI; and, as well as in this study, the galls were noticeable at 18 DAI. In a study with tomato plants inoculated with 5,000 J of *M. incognita*, the formation of typical galls on the roots could be seen 15 DAI (Corrêa 2005). Here, 66 DAI the galls on the parsley had a more irregular shape, were slightly larger and in greater quantity, as in the okra parasitized by *M. incognita*, but in this culture most galls were united in a swelling and had a more elongated shape (Vilela et al 2021). The size of galls usually depends on the species of plant infected or the number of nematodes present in the

tissue (Ornat and Sorribas 2008). In grasses and onions, galls are usually small and barely perceptible, sometimes no more than slight protrusions (Mitkowski and Abawi 2003), as in the banana tree in which *M. incognita* induced the formation of small galls on thin roots or dilations on thicker roots (Niño Castañeda 2015).

In parsley cv. Robustus parasitized by *M. javanica*, the roots presented large spherical galls, individual or grouped, and some contained an egg mass (Sasanelli 2015), also found in coriander, but with smaller isolated galls occurring along the roots (Biondi et al. 2001). The egg mass could be noticed in the parsley after the 5th week (at 39 DAI in anatomy) and at 45, 54 and 66 DAI it was visible on the surface of the galls. The full cycle of *Meloidogyne* spp., from egg to egg, usually happens in the summer taking around three to four weeks and is influenced by factors such as temperature. The female can produce more than 2000 eggs, which are surrounded by a mucilage that protects them against desiccation and adverse conditions (Pinheiro 2021).

4.3 Anatomical traits of root-knot galls

Giant cells were observed at all times evaluated from 18 DAI onwards. These cells are a key factor for the success of the nematode/plant interaction after the arrival of this parasite at the cortical cylinder. If the nourishing cells are not formed, or are degenerated with few or no nuclei, the development and/or reproduction of this parasite will be suppressed, showing a resistant response of the host plant (Expósito 2020) that did not occur in this study, since the giant cells remained well formed until 66 DAI.

After the 18th DAI, 2 to 8 giant cells were found forming the feeding site of the female *M. incognita* in the galls. Normally, 3 to 8 giant cells can be found around the anterior region of the nematode or at the point where it inserts the stylet, with the goal of inducing and maintaining these cells in case there is continuous stimulation from the nematode (Moura 1996). Giant cells induced by *M. incognita* are already noticeable 8 DAI and are multinucleated and thick-walled (Oliveira 2006). These characteristics were also found in the present study.

A well-formed feeding site with several giant cells can be noted 25 DAI, characterizing this site as efficient for nematode nutrition, and the presence of five to nine giant cells per feeding site is enough to promote the perfect development of the nematode (Silva et al. 1990). The disorganization of the vascular cylinder is clear, which suggests a possible impairment of its functions that may lead to a reduction in the transport of water and nutrients through the

xylem (Dorhout et al. 1991). The female of *M. incognita* can be observed close to the nourishing cells between 32 and 39 DAI. In a longitudinal section of banana roots parasitized by this nematode, the female had a dilated body, typical of the genus, with piriform shape and rounded, globose, and oval perineal patterns (Niño Castañeda 2015), producing an egg mass external to the root and visible to the naked eye (Pinheiro et al., 2014). Giant cells act as a nutritive drain, as they mobilize photoassimilates to these cells, and serve as continuous food for females (Abad et al. 2003). Following the formation of the feeding site, and in addition to hyperplasia of adjacent tissues, parsley cv. Robustus infected by *M. javanica* showed giant cells (3-6) adjacent to vascular tissues and distortion in such tissues (Sasanelli 2015). Several feeding sites can be observed in the galls of parsley 66 DAI, as well as in corn (*Zea mays*), which had feeding sites 60 DAI, with giant cells presenting walls thicker than normal cells causing visible compression and even the obliteration of xylem vessel elements (Asmus and Ferraz 2000).

Studies on changes in root anatomy of susceptible plants and on the development of giant cells are important to understand the mechanisms of nematode parasitism by documenting these changes in host root tissues (Westerich 2012).

4.4 Immunocytochemistry

The immunocytochemical studies show differences regarding the presence/abundance of pectin and hemicellulose epitopes in the walls of giant cells in roots parasitized by the pathogen (25, 66 DAI) and walls of non-parasitized root cells (66 DNI). In order to understand the molecular architecture of the cell wall, monoclonal antibodies have been used to detect markers for developmental stages of signals derived from the cell wall (Willats et al. 2000). The cell walls of gall-induced giant cells undergo the process of thickening and loosening to allow expansion and support nutrient uptake by this parasite (Albersheim 2011; Zhang et al. 2017).

Homogalacturonans (HGs) with low methyl-esterification and recognized by JIM5 were marked in basically all cells of the inoculated root 66 DAI. The formation of the gall requires a process of cell hypertrophy and the appearance of giant cells. Especially in this final phase, the marking in the inoculated root may be related to the bonds between HGs and Ca²⁺, the latter interacting with the dimethyl-esterification gels providing rigidity to the cell walls. This dynamics of flexibility and rigidity is essential for the development and maintenance of the final form (Isaias et al, 2013). JIM 7 methyl-esterified HGs were marked

in the late stages of the inoculated root 66 DAI, but also in the 66 DNI. Similar markings were observed in the walls of okra root cells parasitized by *M. incognita* 66 DAI and DNI (Vilela et al. 2021). HGs are the most abundant polysaccharide in pectin (Caffall and Mohnen 2009), and are associated with plant development, biotic stress (Senechal et al. 2014), and cell wall resistance (Caffall and Mohnen 2009). As HGs were present in parsley giant cells, we believe that their abundance may be related to a greater flexibility of the giant cell wall (Albersheim 2011), thus providing a nutrition supply necessary for the development of the nematode.

Xyloglucan (XG) epitopes, marked by LM15, are one of the hemicelluloses frequently found in plants (Obel et al. 2006), which appears to be involved in cell growth signaling, and is responsible for the spacing and ordering of cellulose microfibrils (Oliveira Junior et al. 2006). They were marked in the uninoculated root and widely marked in the final stage of the inoculated root (66 DAI). Xyloglucan, methyl-esterified pectic HGs and arabinan were present in the walls of giant cells of *Arabidopsis thaliana*, *Vigna angularis* and *Zea mays* infected with *M. incognita* (Bozbuga 2017). They were also noted in the giant cells of parsley, but the epitopes of (1 → 5) α -L-arabinans, recognized by LM6 that acts on the wall stiffness, were not detected in the analyzed roots, although they were abundant within the syncytial cell walls in potatoes and soybean roots parasitized by cyst nematodes (Zhang et al. 2017) and in the insect-induced phases of gall maturation and senescence (Carneiro et al. 2014). We noticed variations in the pectic composition of the cell wall, which may be related to the different phases of cell differentiation, growth and plant development (Carneiro et al. 2014).

Rhamnogalacturonan-I (RG-I) is a complex pectic polysaccharide (Harholt et al. 2010) involved in cell wall tension (Mikshina et al. 2015) and in altering the mechanical structure of the plant cell wall (Bidhendi and Geitmann 2016). Recognized by LM5, (1→4) β -D-galactan epitopes were detected in the same cells in the cortex, xylem and phloem parenchyma cells in uninoculated roots and also in the initial and final stages of inoculated roots, but they were not marked in the giant cells of parsley or okra (Vilela et al. 2021), apparently playing no role in the formation of these cells.

5 Conclusion

i) The root-knot nematode *M. incognita* affected the development of parsley, contributing negatively to the reduction of height and weight, both in the shoot and in the root system, in addition to the length of the roots.

- ii) The galls and giant cells were noticed at 18 DAI and caused a disorganization in the root structure, mainly in the vascular system, which could interfere with sap transport.
- iii) Hemicelluloses and pectins were detected differently in control roots at the final stage and inoculated at the initial and final stages and we believe that homogalacturonans are involved in the flexibility of the cell wall of giant cells essential for parasitism of this nematode.

References

- Aguirre Y, Crozzoli R, Greco N (2002) Effect of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on growth of beetroot (*Beta vulgaris*). *Fitopatol. Venez* 15:13-16.
- Akinsanya AK, Afolami SO, Kulakow P, Coyne D (2020) The root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, profoundly affects the production of popular biofortified cassava cultivars. *Nematology*, 22(6): 667-676. <http://doi.org/10.1163/15685411-00003331>
- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A (2011) Plant Cell Walls, from Chemistry to Biology. Garland Science, New York, pp. 227–272.
- Asmus GL, Ferraz LCCB, Appezzato BG (2000) Alterações anatômicas em raízes de milho (*Zea mays* L.) parasitadas por *Meloidogyne javanica*. *Nematropica*, 30 (1): 33-39.
- Asmus GL (2001) Danos causados à cultura da soja por nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: Ferraz, L.C.C.B.; Asmus, G.L.; Carneiro, R.G.; Mazaferra, P.; Silva, J.F.V. Relações parasito-hopedeiro nas meloidoginoses da soja. Embrapa Soja, Londrina, PR, p. 39-56.
- Asmus GL (2004) Ocorrência de nematoides parasitos em algodoeiro no estado de Mato Grosso do Sul. *Nematologia Brasileira* 28(1): 77-86.
- Asmus GL, Inomoto MM, Silva RA, Galbieri R (2015) Manejo de nematoides. In: Freire, E.C. (ed.). Algodão no cerrado do Brasil. Abrapa, Brasília, Brasil: Gráfica e Editora Positiva, p.445-483.
- Bohlmann H, Sobczak M (2014) The plant cell wall in the feeding sites of cyst nematodes. *Frontiers Plant Science* 5:1–10 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00089>
- Bordin SS (2002) Interação fungos micorrízicos arbusculares e *Meloidogyne incognita*, em plantas de tomateiro e pimentão. ix,70 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas.
- Bozbuga R, Lilley CJ, Knox JP, Urwin PE (2018) Host-specific signatures of the cell wall changes induced by the plant parasitic nematode, *Meloidogyne incognita*. *Sci Rep.* 8 (1): 17302 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35529-7>
- Biondi CM, Prado MDC, Medeiros JE, Pedrosa EMR, Moura RM (2001) Tolerância do coentro ao parasitismo do nematoide *Meloidogyne incognita* raça 1. *Nematologia Brasileira*, Campinas, 25 (2): 239-241.
- Bridge J, Plowright RA, Peng D (2005) Nematode parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R.A., & Bridge, J. (eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 87–128.
- Bidhendi AJ, Geitmann A (2016) Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. *J Exp Bot* 67: 449–461.
- Caffall KH, and Mohnen D (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344, 1879–1900. doi: 10.1016/j.carres.2009.05.021

Carvalho LM (2010) Qualidade em plantas medicinais. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros 54 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329 http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_162.pdf Accessed 21 august 2021.

Carneiro RGS, Castro AC, Isaias RMS (2014) Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. *South African Journal of Botany* 92: 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.02.011>

Cătunescu GM, Rotar I, Vidican R, Bunghez F, Rotar AM (2017). Gamma radiation enhances the bioactivity of fresh parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss Var. Neapolitanum). *Radiation Physics and Chemistry* 132: 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.11.010>

Coolen WA, D'Herde CJ (1972) A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agricultural Research Centre, Ghent.

Corrêa CF (2005) Alterações anatômicas e fases do desenvolvimento de células gigantes induzidas por nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) em raízes de plantas suscetíveis. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas/ Botânica. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, pp. 150.

Dorhout R, Gommers FJ, Kollöffel C (1991) Water transport through tomato roots infected with *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, St. Paul, 81(4): 379-385.

Escobar C, Barcala M, Cabrera J, Fenoll C (2015) Overview of root-knot nematodes and giant cells. *Adv. Bot. Res* 73:1–32.

Expósito A, Pujolà M, Achaerandio I, Giné A, Escudero N, Fullana AM, Cunquero M, Loza-Alvarez P, Sorriba FJ (2020) Tomato and Melon *Meloidogyne* Resistant Rootstocks Improve Crop Yield but Melon Fruit Quality Is Influenced by the Cropping Season. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.560024>

Grossi de Sá M (2011) Análise funcional de genes expressos em glândula esofágica dorsal de *Meloidogyne incognita* envolvidos no fitoparasitismo. 67p. Dissertação (Mestre em Ciências Gênicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília (DF).

Guidoni C (2011) Salsa Da Roça, mais resistência, melhor rendimento. Horticultores sementes. <https://www.horticultores.com.br/noticias/salsa-da-roca-mais-resistencia-melhor-rendimento/> Accessed 21 september 2021.

Hallmann J, Meressa BH (2018) Nematodes parasites of vegetables. *In* Sikora, R. A, Coyne, D., Hallmann, J., Timper, P. (eds.) *Plant parasitic nematodes*. CAB International, Wallingford, UK.

Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology* 153:384-395.

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

Isaias RMS, Carneiro RGS, Oliveira DC, Santos JC (2013) Illustrated and annotated checklist of Brazilian gall morphotypes. *Neotropical Entomology*. 42: 230- 239.

Keegstra K (2010) Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154: 483-486.

Kraus JE, Arduin M (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, EDUR.

Kofoed CA, White WA (1919) A new nematode infection in mam. *J Amer. Med. Assoc.*, 72: 567-569.

Lana MM (2021) Cheiro Verde, Tempero verde para todos os pratos. Embrapa Hortaliças. Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortaliça-nao-e-so-salada/cheiro-verde> Acesso em: 15 de novembro 2021.

Lozada-Villanueva LS, Casa-Ruiz TG, Belle C (2021) Response of parsley to different population densities of *Meloidogyne arenaria*. *Rev. investig. Altoandin Puno*, 23 (1): 55-60 <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2021.226>

Martini, VC (2017) Gradientes funcionais em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) em *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae): Composição da parede celular e metabólitos. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Uberlândia. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.711>

Martinello GE, Leal NR, Pimentel JC (2001) Avaliação da resistência de genótipos de quiabeiro à infestação por *Meloidogyne incognita* raça 2 e *M. javanica*. *Horticultura Brasileira*, 19 (2): 115-117. ISSN 1806-9991. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362001000200003>

Mitkowski NA, Abawi GS (2003) Nematode de galhas. *The Plant Health Instructor*, EUA.

Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3): 266- 277.

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* Species –a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J.L (Ed.). *Root-knot Nematodes*. UK: CAB International, pp.1-13.

Moreira FJC, Albuquerque AM, Almeida BKS, Souza IM, Araújo B de A, Guedes FL (2018) Reação de genótipos de feijão guandu (*Cajanus cajan* L.) Millspaugh ao nematode das galhas (*Meloidogyne enterolobii*). *Summa Phytopathologica*, 44 (4): 380-385.

Mikshina PV, Idiyatullin BZ, Petrova AA, Shashkov AS, Zuev YF, Gorshkova TA (2015) Physicochemical properties of complex rhamnogalacturonan I from gelatinous cell walls of flax fibers. *Carbohydr Polym* 117: 853–861.

Moura RM (1997) O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. In: Luz, W. C. (Ed). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo: Pe. Berthier, pp. 281-315.

Moura RM (1996) O Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo: RAPP, cap. 6, 4: 209-244.

Niño Castañeda NE (2015) Estudo da interação *Musa acuminata*- *Meloidogyne incognita*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, pp. 267.

Ntalli N, Zioga D, Argyropoulou Dm, Papatheodorou Me, Menkissoglu-Spiroudi U, Monokrousos N (2019). Anise, parsley, and rocket as nematicidal soil amendments and their impact on non-target soil organisms. *Applied Soil Ecology* 143:17-25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.05.024r>

Neuschrack EL, Heller E, Correia GS, Manske GM, Oxley HN, Gomes CB (2019) Patogenicidade de *Meloidogyne* sp. 0 (Est. R0) em arroz irrigado. XXVIII Congresso de iniciação cinetífica. 5ª Semana Integrada. UFPEL.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>

Oliveira DS (2006) Patogenicidade de populações de *Meloidogyne incognita*, proveniente de Minas Gerais e São Paulo, ao cafeeiro. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

Oliveira CB da S (2016) Ensaio de cultivares de salsa (*Petroselinum crispum*) em canteiro sob ambiente protegido. 35 f., il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Agronomia)- Universidade de Brasília, Brasília.

Ornat C, Sorribas FJ (2008) Integrated management of root-knot nematodes in mediterranean horticultural crops. In: Ciancio, A.; Mukerji, K.G. Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. Dordrecht: Springer. pp. 259-312

Obel N, Neumetzler L, Pauly M (2006) Hemicelluloses and cell expansion. In *The Expanding Cell*. Berlin: Springer, 6: 57– 88.

Pauly M et al (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238 (4): 627–642.

Pinheiro JB, Carvalho ADF, Vieira JV (2010) Reação de cultivares de cenoura a *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Meloidogyne mayaguensis*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças 20 p. (Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 69).

Pinheiro JB, Rodrigues C da S, Carvalho ADF de, Pereira RB (2011) Nematoides na cultura da batata-doce. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 105.

Pinheiro JB, Reifschneider FJ, Pereira RB, Moita AW (2014) Reação de genótipos de *Capsicum* ao nematoide- das-galhas. *Horticultura Brasileira* 32: 371-375.

Pinheiro B (2016) Nematoides. *Árvore do conhecimento*. <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn0k9bx902wx5ok0liq1mqut1365k.html> Accessed 21 october 2021.

Pinheiro JB. Nematoides de galhas. Árvore do conhecimento cebola. <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cebola/arvore/CONT000gnnmwiki02wx5ok0cdjvscvuqw40o.html> Accessed 21 december 2021.

Pinheiro JB, Pereira RB (2016) Manejo de nematoides na cultura do coentro e salsa. Brasília - DF: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica 149).

Proz MDLÁ (2020) Compostos bioativos em salsa (*Petroselinum crispum*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) produzidos sob diferentes sistemas de cultivo. <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/211907> Accessed 18 december 2021.

R Core Team (2020) R: A language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Rosa JMO, Westerich JN, Wilcken SRS (2013) Reprodução de *Meloidogyne javanica* em olerícolas e em plantas utilizadas na adubação verde. Trop. plant pathol 38 (2) p.133-141. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000200007>

Rosa JMO, Westerich JN, & Wilcken SRS (2015) Reprodução de *Meloidogyne enterolobii* em olerícolas e plantas utilizadas na adubação fresca. Revista Ciência Agrônômica, 46(4), 826-835. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150071>

Sasanelli N, Vovlas N, Cantalapedra-Navarrete C, Lucarelli G, Palomares-Rius JE, Castillo, P (2015) Parasitism and pathogenicity of curly-leaf parsley with the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in Southern Italy. Institute of Parasitology, SAS, Košice, 348 Helminthologia, 52, 4: 348 – 354. <https://doi.org/10.1515/helmin-2015-0055>

Starr JL (1998) Cotton. In: Barker, K. R.; Pederson, G. A.; Windhan, G. L. (ed.). Plant and nematode interaction. American Society of Agronomy, Madison, Estados Unidos, pp. 359-379.

Silva GS, Ferraz S, Santos JM (1990) Histopatologia de raízes de crotalária parasitadas por *Meloidogyne javanica*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 15 (1): 46-48.

Silva AR, Santos JN (2007) Nematoides na Cultura da Batata no Brasil. 1ª edição, São Paulo, Associação Brasileira da Batata - ABBA, pp. 55.

Souza RL, Maximiano CV (2018) Avaliação de resistência de batata-doce a nematoide-das-galhas spp. Anais do 14 Simpósio de TCC e 7 Seminário de IC da Faculdade ICESP (14): 223-230.

Souza GLR de (2018) Como realizar o manejo de nematoides em sistemas de produção agrícola. <https://institutoagro.com.br/manejo-de-nematoides/> Accessed 20 november 2021.

Salla OS, Guido ZNS, Scherer V, Reis FB, Torres SP, Ribeiro, PFDA (2019) Ação antioxidante de ervas utilizadas na culinária brasileira. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 10 (2). <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/99946> Accessed 20 november 2021.

- Sasanelli N, Vovlas N, Cantalapiedra-Navarrete C, Lucarelli G, Palomares-Rius JEC (2015) Parasitism and pathogenicity of curly-leaf parsley with the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in Southern Italy. 2015 Institute of Parasitology, SAS, Košice DOI 10.1515/helmin-2015-0055 348 Helminthologia, 52 (4): 348 – 354.
- Senechal F, Wattier C, Rusterucci C, Pelloux, J (2014) Homogalacturonan modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. J. Exp. Bot. 65: 5125–5160. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru272>
- Sikora RA, Fernandez E (2005) Nematodes parasites of vegetables. In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. ed. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford UK, pp. 319-392.
- Silva GS, Sobrinho CA, Pereira AL, Santos JM. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Estado do Piauí. Nematologia Brasileira 30: 307-309, 2006.
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. Annual Review of Plant Biology 61(1): 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Taylor AL, Sasser JN (1978) Biology, identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* species). NCSU & USAID Coop Publ, Raleigh.
- Tihohod D (2000) Nematologia Agricola Aplicada. 2 ed. Jaboticabal, São Paulo SP.
- Vale FXR, Lopes CA, Alvarenga, MAR (2013) Doenças fúngicas, bacterianas e causadas por nematoides. In: ALVARENGA, M. A. R. (Ed.). Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia. Lavras: UFLA, p. 445.
- Vilela RMIF, Martini VC, Gonçalves L d A, Kuster VC, Oliveira DC (2019) Structure and development of root gall induced by *Meloidogyne javanica* in *Glycine max* L. Semina: Série botânica 40:1033–1048. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n3p1033>
- Vilela RMIF, Kuster VC, Magalhães TA, Moraes CA, De Paula Filho AC, de Oliveira DC (2021) Impact of *Meloidogyne incognita* (nematode) infection on root tissues and cell wall composition of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench, Malvaceae). Protoplasma <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01618-0> Epub ahead of print. PMID: 33532872
- Westerich JN, Rodella RA, Rosa JMO, Wilcken SRS (2012) Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (*M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. Summa Phytopathologica, 38 (3):192-197.
- Wickham H (2010) *ggplot2: An Implementation of the Grammar of Graphics*. R package version 0.8.7, URL: <http://CRAN.R-project.org/package=ggplot2> Accessed 20 september 2021.
- Wilson SM, Ho YY, Lampugnani ER, Van de Meene AML, Bain MP, Bacic A, Doblin MS (2015) Determining the subcellular location of synthesis and assembly of the cell wall polysaccharide (1,3; 1,4)- β -d-glucan in grasses. Plant Cell 27: 754–771.

Zhang DL, Wang HY, Ji XX, Wang KY, Wang D, Qiao K (2017) Effect of abamectin on the cereal cyst nematode (CCN, *Heterodera avenae*) and wheat yield. *Plant Disease* 101: 973–976.

Zhao X. et al (2000) Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. *Phytopathology*, Saint Paul, 90 (11): 1239-1245. doi: ISSN 0031-949X.

Appendix 1

Monoclonal antibodies and epitopes used for labeling pectin and hemicellulose compounds.

Monoclonal Antibody	Epitopes	References
Pectins/ Homogalacturonan (HG)		
JIM 5	partially Me- HG/ no ester	VanderBoshet al. (1989); Knox et al. (1990); Willats et al. (2000); Clausen et al. (2003)
JIM 7	partially Me- HG	Knox et al. (1990); Willats et al. (2000); Clausen et al. (2003)
Pectins/Rhamnogalacturonan-I		
LM 5 (1 ->4)	β - D galactan	Jones et al. (1997); Willats et al. (1999); Orfila e Knox (2000)
LM 6 (1 ->5)	α - L- arabinan	Willats et al. (1999); Orfila e Knox (2000)
Hemicellulose		
Heteroxylyan		
LM 11(1 ->4)	β - D Xylan/arabinoxylan	McCartney et al (2005)
LM 21	heteromannan	Marcus et al (2010)
LM 15	XXXG motif of xyloglucan	Marcus et al (2008)

**ARTIGO 4 – GALHAS INDUZIDAS POR *Meloidogyne incognita* NO JILOEIRO
(*Solanum gilo* RADDI): IMPACTO ESTRUTURAL E NOS PARÂMETROS
FITOTÉCNICOS E AINDA CONTROLE COM *Paecilomyces lilacinus***

**(VERSÃO PRELIMINAR)
NORMAS DO PERIÓDICO PROTOPLASMA**

Galhas induzidas por *Meloidogyne incognita* no jiloeiro (*Solanum gilo* Raddi): impacto estrutural e nos parâmetros fitotécnicos e ainda controle com *Paecilomyces lilacinus*

Roberta Mendes Isaac Ferreira Vilela, Vinícius Coelho Kuster, Andréa Avelino De Souza, Vitor Campana Martini & Denis Coelho de Oliveira

Resumo

Meloidogyne é um dos gêneros de nematoides de maior importância na agricultura mundial, uma vez que causa perda na produtividade em culturas hospedeiras, como no jiloeiro (*Solanum gilo*). Esse nematoide forma galhas nas raízes das plantas parasitadas, bem como sítios de alimentação constituídos de células gigantes. O controle biológico tem auxiliado na redução da perda de produtividade, com destaque para os que utilizam fungos como *Paecilomyces lilacinus*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de *Meloidogyne incognita* no desenvolvimento do jiloeiro, assim como testar um nematicida microbiológico (*P. lilacinus*) como agente de controle biológico. O impacto do nematoide foi aqui estimado por avaliações agronômicas, histológicas e quanto a composição da parede celular analisada em relação as alterações dos compostos pécnicos e hemicelulósicos. As plantas foram inoculadas com 5000 juvenis de 2º estágio (J2) de *M. incognita* e as amostras para os estudos histopatológicos foram coletadas aos 04, 11, 18, 25, 32, 39, 46, 54, 66 e 72 dias após a inoculação (DAI). Nas análises agronômicas foram realizadas aos 72 DAI, enquanto que as de imunocitoquímica também aos 25 DAI. Houve redução do crescimento, do peso da raiz e da parte aérea em plantas inoculadas com *M. incognita*, enquanto plantas controlee plantas inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus* apresentaram resultados semelhantes. Galhas e células gigantes foram observadas aos 18 DAI em ambos os tratamentos com inoculação. *P. lilacinus* não interferiu na formação das células gigantes das galhas, porém reduziu a quantidade de nematoides e ovos nas raízes. O jiloeiro é susceptível a *M. incognita*, sendo a cultivar jiló Comprido Verde Claro altamente susceptível, uma vez que possui mais de 100 galhas por raiz. As marcações dos epitopos de polissacarídeos ocorreram de forma distinta entre as raízes não inoculadas e entre os estágios de desenvolvimento da galha. Homogalacturonanos altamente esterificados indicam a presença de paredes celulares flexíveis nas galhas jovens, inclusive nas células gigantes, com paredes mais rígidas com a baixa metilesterificação observada nas células maduras. Por fim, o jiloeiro foi impactado negativamente no crescimento da sua parte aérea e ganho de massa, porém o uso de um do fungo *P. lilacinus* pode reduzir os danos na cultura.

Palavras-chave: Anatomia de galhas. Jiló. Células gigantes. Parede celular. Controle biológico.

1 Introdução

Nematoides indutores de galhas são endoparasitas obrigatórios e sedentários que formam sítios de alimentação na região do sistema vascular de raízes de plantas hospedeiras (Escobar et al. 2015; Galbieri e Belot 2016), onde completam o seu ciclo de vida (Ye et al. 2019). Os estímulos gerados pelos nematoides levam, então, a formação de células gigantes, que são o seu sítio de alimentação, e aumento da divisão e crescimento celular no córtex da raiz, resultando na formação de galhas (Pinheiro 2019; Galbieri e Belot 2016). O ciclo de vida destes nematoides, especialmente das espécies de *Meloidogynne* spp., desperta grande interesse devido ao impacto que estes organismos geram em diversas culturas de importância agrônômica em todo mundo (Koenning et al. 2004; Dijan-Caparalino 2012; Onkendi et al. 2014).

Os nematoides juvenis de segundo estágio (J2) penetram nas raízes, na zona meristemática, migram célula a célula até a zona de alongamento da raiz e, seguem em direção ao cilindro vascular (Cepulité et al. 2018). No sistema vascular, os nematoides do gênero *Meloidogyne* induzem a formação de células gigantes (Heller et al. 2019) que são essenciais para nutrição e desenvolvimento do nematoide galhador. Depois se fixarem e induzirem os sítios de alimentação, os nematoides passam pelos estágios três e quatro até chegarem à fase adulta (Oliveira 2016), cujas fêmeas depositam os ovos em uma matriz gelatinosa (Pinheiro 2021) e os machos deixam as raízes sem causar danos às hospedeiras (Cares et al. 2006).

O desenvolvimento e estabelecimento das células gigantes dependem de uma série de alterações na estrutura e composição da parede celular, com ganho em elasticidade e porosidade, essenciais para o crescimento e o fluxo de nutrientes nestas células (Caillaud et al. 2008, Bozbuga et al. 2018, Vilela et al. 2019). A parede celular é composta principalmente por celulose, hemiceluloses e pectinas (Defillipi et al., 2018), sendo que a proporção destes polímeros pécnicos e o grau de esterificação das moléculas estão relacionados com as propriedades funcionais da parede celular vegetal (Knox, 1997). Esses polímeros desempenham diversas funções nas plantas, como manter e determinar a forma celular (Szymanski, 2009; Singh e Montgomery, 2011), controlar o crescimento celular e vegetal (Wolf et al., 2012), resistir à pressão de turgor interna (Haswell et al., 2008) e atuar na percepção e sinalização durante o desenvolvimento da planta, ativando mecanismos de defesa (Hamann, 2012; Nühse, 2012). Na interação patogênica entre plantas e microorganismos ocorre uma cascata de eventos, e estudos que abordem as modificações ocorridas na parede

celular utilizando anticorpos monoclonais podem auxiliar no entendimento dessa complexa relação e auxiliar na busca por resistência aos patógenos (Ñino Castañeda, 2015). De fato, compreender o processo de infecção do nematoide nas raízes e o desenvolvimento de sítios de alimentação nas galhas é relevante para identificar mecanismos de controle do patógeno.

O controle do nematoide de galhas é fundamental devido ao seu impacto na produtividade de culturas de interesse econômico, sendo recomendada a ação conjunta entre vários métodos, tais como rotação de culturas, o uso de genótipos resistentes, controle biológico e químico (Almeida et al. 2005).

O uso de produtos fitossanitários sintéticos para controle de nematoides tem sido adotado, porém encontra-se cada vez mais restrito devido ao alto custo, a baixa eficácia ao longo de várias aplicações e pela toxicidade, com risco de contaminação dos recursos hídricos e perda da biodiversidade (Dong e Zhang 2006; Araújo et al, 2012; FAO e Who, 2016). Por outro lado, o controle biológico com fungos nematófagos tem a capacidade de capturar ou parasitar nematoides em seus diferentes estágios de vida e são divididos em grupos conforme seus diversos modos de ação, podendo ser ectoparasitas, endoparasitas, parasitas de fêmeas e ovos ou produtores de metabólitos tóxicos (Alves e Freitas 2014). Um exemplo é o *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, que é um fungo de solo que tem se mostrado efetivo no controle de espécies de nematoides de galhas (Campos; Campos et al. 1990, 1997; Kerry, 1990), afetando diretamente a capacidade reprodutiva deste microrganismo (Ballagro 2020).

As medidas de controle são necessárias principalmente para as espécies de plantas que apresentam susceptibilidade aos nematoides, como o jiloeiro *Solanum gilo* Raddi (Solanaceae), que embora seja uma das espécies mais rústicas das solanáceas, é sensível ao ataque de nematoides do gênero *Meloidogyne* (Pinheiro et al. 2013), com maiores preocupações devido a sua ampla distribuição geográfica e a extensa gama de hospedeiros (Ferraz e Brown, 2016).

As espécies *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* são os principais nematoides de galhas no Brasil e causam grandes perdas econômicas em diversas culturas (Oliveira et al 2018), inclusive nas solanáceas (Bernard et al. 2017). O *M. incognita* (Heteroderidae) (Kofoid e White 1919) se destaca em função da alta polifagia (Huang et al. 2006), elevada capacidade reprodutiva e agressividade (Bakhetia et al. 2005).

Neste contexto, a relevância do estudo do comportamento da infecção de plantas de jiloeiro por nematoides é baseada no fato de se tratar de uma espécie de hortaliça de grande relevância para agricultura familiar e com boa aceitação no mercado brasileiro por possuir fruto com sabor amargo, com propriedades antioxidantes (Odetola et al. 2004; Pinheiro et al.

2013; Pinheiro et al. 2015) e de elevado valor nutricional e terapêutico elevados (Odetola, Iranloye e Akinloye, 2004). Assim, em infestações elevadas esses microrganismos poderão contribuir, negativamente, para redução do desenvolvimento da planta e da produtividade da cultura. Diante do exposto, o presente estudo buscou: (i) avaliar o efeito do parasitismo do nematoide *M. incognita* nas características agrônômicas da cultura do jiloeiro *S. gilo*; (ii) determinar a eficiência do produto biológico à base do fungo *P. lilacinus* no controle do galhador, na inibição da formação de galhas e das células gigantes; (iii) descrever as modificações estruturais nas raízes inoculadas com esse parasita durante o desenvolvimento das galhas e formação das células gigantes; e (iv) caracterizar as alterações na estrutura e composição da parede celular em relação a compostos pécicos e hemicelulósicos remobilizados para formação de células gigantes.

2 Material e métodos

2.1 Área de estudo e desenho experimental

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Centro Universitário de Goiatuba - Unicerrado, município de Goiatuba (18° 00' 45" S, 49° 21' 17" W), Goiás, Brasil. Foi utilizada a cultivar do jiloeiro, Comprido Verde Claro (Topseed®), que é susceptível ao nematoide *M. incognita* e preferida nos mercados de Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Alves 2016).

As sementes foram semeadas em dezembro de 2020 em duas bandejas de plástico de 100 células cada, contendo o substrato para mudas Bioplant® (Turfa de sphagnum, fibra de coco, casca de arroz, casca de pinus, vermiculita). Após 20 dias de emergência, as mudas foram transplantadas para vasos de 2,8 L contendo o substrato esterilizado na proporção 1:1 de areia e solo do tipo Latossolo Vermelho Distrófico Santos et al. (2018). A mistura de areia e solo que constitui o substrato foi esterilizada em autoclave a 120° C por 1 h.

Após seis dias do plantio, realizou-se a inoculação dos nematoides em 100 plantas de jiló, em dois orifícios próximos as raízes com a utilização de uma pipeta contendo a suspensão de 5.000 juvenis (J2) de *M. incognita* em cada 2ml de inoculo, previamente multiplicado em outras cultivares de jiloeiro e extraídos de acordo com o método de Coolen & D'Herde (1972, modificada). Em 50 dessas plantas também foram adicionadas nematicida microbiológico, à base do fungo *P. lilacinus*, na concentração: 7,5x10⁹ UFC/g, indicado para controle de nematoide-das-lesões-radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e nematoides-das-

galhas (*M. javanica* e *M. incognita*) (Ballagro 2021). O produto foi aplicado na “cova” do vaso, pouco antes do transplante da muda, na quantidade recomendada pelo fabricante, na qual adaptamos para vasos, sendo preparada uma calda com 4 litros de água e 0,04 g do produto, com aplicação total de 100 mL por vaso. As outras 50 plantas restantes foram mantidas como grupo controle, ou seja, sem inoculação. Desta forma, o experimento foi constituído por três tratamentos (1- Controle, 2- Inoculação de nematoide, 3- Inoculação de nematóide + aplicação de nematicida a base do fungo *P. lilacinus*. Então foram 3 tratamentos com 10 repetições. Cada parcela foi composta por cinco vasos e cada vaso continha uma planta em delineamento de blocos casualizados. Após 15 dias do transplante das mudas, foi utilizado 8 g do formulado Forth Cote (15-09-12) em cada vaso para a nutrição das plantas. As plantas foram irrigadas diariamente utilizando regador de 8L de capacidade.

2.2 Avaliação de características agronômicas e desenvolvimento da cultura

As avaliações das características agronômicas e quantificação das galhas foram realizadas aos 72 dias após a inoculação (DAI), um pouco antes da colheita tradicional do jiló que ocorre entre 80 e 100 dias após a sementeira (Pinheiro et al. 2015), porém essa cultivar ainda não apresentava frutos. Inicialmente as plantas foram retiradas dos vasos, as raízes foram lavadas para se retirar as partículas de solo e colocadas em folhas de papel toalha para se retirar o excesso de umidade. Nesse momento, foram analisados os seguintes parâmetros: (i) massa fresca da parte aérea (MFPA); (ii) massa fresca da raiz (MFR), pesadas com auxílio da balança analítica Balmak ELP-10; (iii) comprimento da raiz (CR); (iv) altura da parte aérea (APA), onde se utilizou a régua graduada em centímetros. Nesse parâmetro foi utilizado como referência a distância entre o colo da planta e a extremidade do broto terminal do ramo principal; (v) massa seca da parte aérea (MSPA), colocadas separadas em saco de papel Kraft e levadas para estufa por 72 horas e pesadas novamente.

2.3 Quantificação dos nematoides e das galhas

Foi avaliado o número de galhas; o número de ovos em 5 g de raiz; e o número de nematoides em 5 g de raiz. Para a extração dos nematoides e ovos das galhas nas raízes utilizou-se a técnica de Coolen & D’Herde (1972, modificada), onde as raízes foram cortadas e trituradas no liquidificador com água e hipoclorito, e a solução foi passada em uma peneira de 500 Mesh. Então se adicionou à solução, o Caulim (pó de cerâmica), centrifugou e após

adicionar uma solução de sacarose, foi centrifugado e peneirado novamente sendo coletado dos nematoides do sobrenadante. Para quantificação dos nematoides, como as raízes têm pesos diferentes foi padronizado o peso da menor raiz (5 g) e calculada uma regra de três para todas as raízes com maior peso. Para visualização dos nematoides e dos ovos, as amostras foram colocadas em lâmina de Peters e observadas em microscópio binocular Bioval® L-1000b-AC.

Para avaliar o nível de resistência da cultivar de jiló, Comprido Verde Claro, ao *M. incognita*, as galhas foram isoladas e contadas de acordo com o Índice de galhas (IG) proposto por Taylor & Sasser (1978), onde o nível de infestação foi caracterizado como: 0 = 0 galhas; 1 = 1-2 galhas; 2 = 3-10 galhas; 3 = 11-30 galhas; 4 = 31-100 galhas e 5 = > 100 galhas. Foram consideradas resistentes as plantas que apresentaram de 0 a 10 galhas (0, 1, 2) e suscetíveis (3, 4, 5) quando as plantas possuíam ≥ 11 galhas.

2.4 Análises anatômicas

Para preparo das lâminas histológicas, foram realizadas coletas de fragmentos vegetais oriundas de: (i) nas plantas do tratamento controle, os fragmentos foram retirados nas porções medianas (próxima as regiões onde se localizavam as galhas retiradas de raízes inoculadas), aos 4 e 66 dias após a não inoculação (DNI); (ii) nas plantas inoculadas com *M. incognita* e inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus* foram retiradas algumas galhas presentes nessas raízes, as galhas selecionadas para as avaliações anatômicas foram as de tamanho médio para os respectivos dias após a inoculação (DAI), ou seja, 04, 11, 18, 25, 32, 39, 46, 54, 66 e 72 DAI. Os fragmentos foram fixados em FAA₅₀ (formaldeído + ácido acético + etanol 50% 1:1:18). As raízes não inoculadas e as galhas foram medidas com auxílio de um paquímetro digital e fotografadas com um microscópio estereoscópico (Leica® EZ4 HD).

Para as avaliações anatômicas, fragmentos das raízes e das galhas foram desidratados em série etanólica, embebidas em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica® Instruments, Germany) e seccionadas transversalmente em micrótomo rotativo (YD-315 model, China) a 6 μm de espessura. Em seguida, os cortes foram corados com azul de toluidina a 1%, pH 4.0 (Feder; O'Brian 1968) e montados com Entellan®. As amostras foram fotografadas com fotomicroscópio Leica® DM500 acoplado com uma câmera Leica® ICC50HD.

2.5 Análises de imunocitoquímica

Para análises de imunocitoquímica foram utilizadas amostras de raízes não inoculadas aos 72 DNI e de galhas inoculadas apenas com *M. incognita*, aos 25 e 72 DAI. Optou-se por não fazer em raízes inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus* por não apresentar diferenças na formação de células gigantes e galhas em relação às raízes inoculadas com *M. incognita*. Os 25 DAI foi selecionado pela presença de células gigantes em estágio inicial de formação, enquanto os 72 DAI por ser um estágio de desenvolvimento no qual as galhas e células gigantes alcançam tamanho máximo no experimento. Para tal, foi utilizado cortes em historesina obtidos segundo técnica descrita previamente, porém sem coloração ou montagem das lâminas.

As amostras sujeitas aos anticorpos monoclonais primários para detecção de hemiceluloses foram previamente tratadas com 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de pectato liase (Sigma-Aldrich) em 2 mM do tampão CaCl_2 , 50 mM do ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanossulfônico (CAPS) (Sigma-Aldrich, USA), pH 10 (Marcus et al., 2008), por 2 h. Em seguida, todas as amostras foram imersas em uma solução bloqueadora de leite em pó Molico[®]/tampão fosfato-salino (PBS), durante 30 minutos. As amostras, então, foram incubadas por 2h nos anticorpos primários monoclonais JIM5, JIM7, LM5, LM6, LM11, LM15 e LM21 (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) (Apêndice 1), diluídos 1:10 em leite / PBS. Após a incubação, os cortes foram lavados em PBS e novamente incubados no anticorpo secundário FITC (1:100 em 3% leite/PBS), por 2h e na ausência de luz. O controle foi obtido por meio da supressão da incubação com os anticorpos primários.

As lâminas foram montadas em glicerina 50% e analisadas no microscópio de fluorescência (DM4000B LED, Leica, Alemanha) acoplado com câmera monocromática HD (DFC3000G). Utilizaram-se os comprimentos de onda de excitação de 450–490 nm e filtro de emissão de 515 nm. Filtro DAPI foi utilizado para marcação da autofluorescência. Assim, resultados positivos (+) foram marcados com a coloração verde, enquanto os negativos (-) de azul.

2.6 Análise dos dados

Para avaliar o desenvolvimento do jiloeiro inoculado com *M. incognita* e *M. incognita* + *P. lilacinus* em comparação com plantas não inoculadas, foram feitas análises de variância ANOVA fatorial, usando cada variável agrônômica como resposta e os tratamentos como

preditoras. Posteriormente, regressões múltiplas utilizando a variável agrônômica como resposta e os tratamentos em interação com as outras variáveis agrônômicas como preditora para se identificar as mudanças nas relações entre as partes em crescimento do vegetal. Também foram realizadas regressões múltiplas para se identificar as relações entre o número de nematoides na raiz e o total de galhas. Todas as análises foram feitas usando o programa estatístico R Core Team (2020) e os pacotes “lme4” para as regressões múltiplas, “MuMIn” para a seleção de modelos e “ggplot2” para desenhar os gráficos.

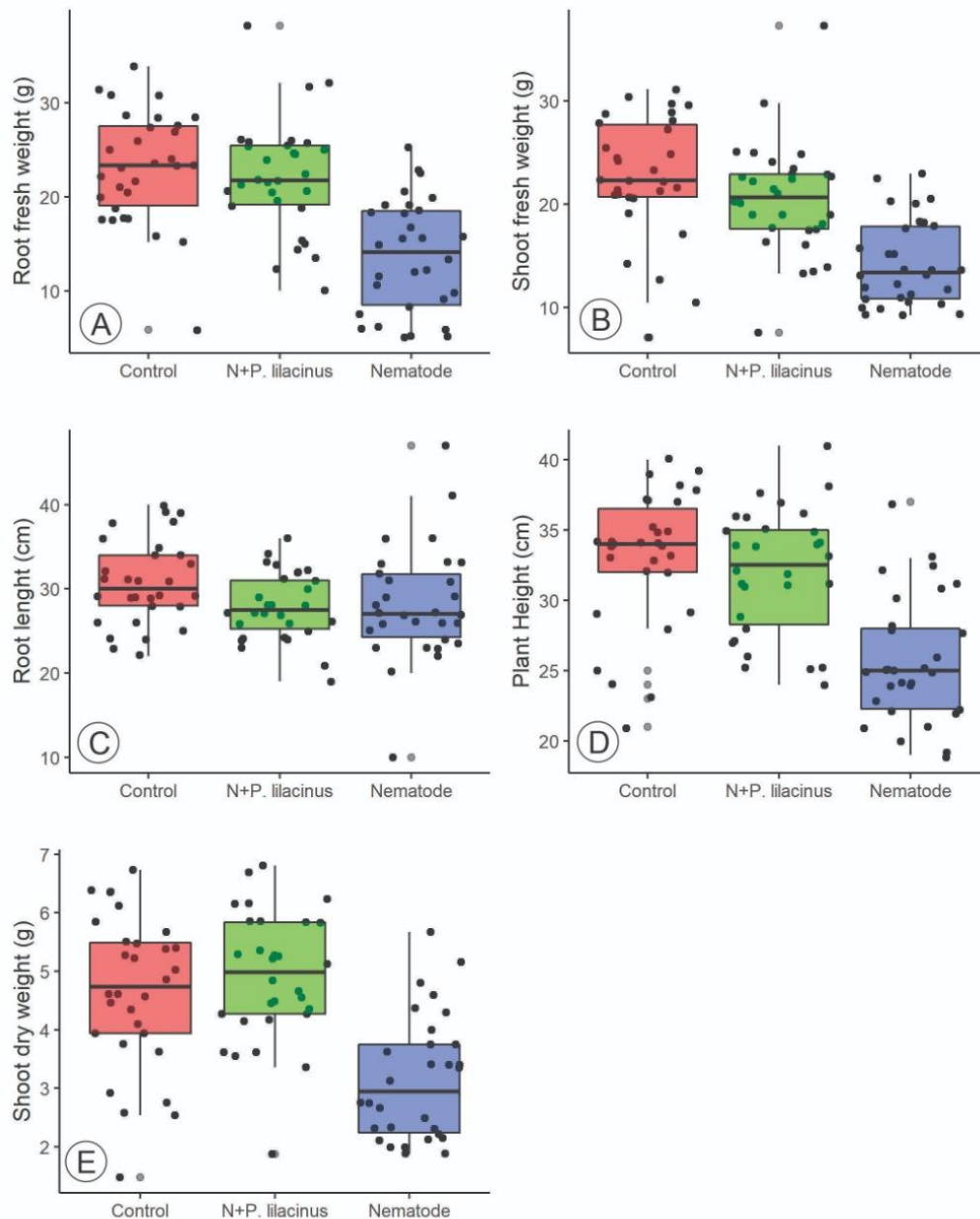
Os dados referentes a quantidade de galhas, nematoides e ovos em 5 g de raiz foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa da Microsoft Corporation® para a geração dos gráficos descritivos, bem como análises de variância e comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR® (Ferreira 2008).

3 Resultados

3.1 Características agrônômicas e de desenvolvimento do jiloeiro

Na comparação entre os tratamentos de cada uma das variáveis (Fig. 1) foi possível notar redução das características agrônômicas nas plantas inoculadas apenas com o *M. incognita*, com exceção da variável comprimento da raiz que foi similar em todos os tratamentos. A massa fresca da raiz em plantas não inoculadas foi semelhante às das inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus* ($p = 0.78$), com uma menor massa fresca da raiz em plantas inoculadas com *M. incognita* ($F_{2,87} = 22.28$; $p < 0.001$; Fig. 1A). A massa fresca da parte aérea mostrou diferença entre os grupos ($F_{2,87} = 20.42$; $p < 0.001$), com similaridade entre o tratamento controle e *M. incognita* + *P. lilacinus* ($p = 0.28$; Fig. 1B). O comprimento da raiz (Fig. 1C) foi a única variável que não teve diferença entre os tratamentos ($p = 0.07$). Na altura da parte aérea (Fig. 1D) houve distinção entre os grupos ($F_{2,87} = 21.93$; $p < 0.001$), sem diferença entre o controle e o tratamento com *M. incognita* + *P. lilacinus* ($p = 0.67$). Na massa seca da parte aérea (Fig. 1E) houve diferença entre os grupos ($F_{2,87} = 19.85$; $p < 0.001$), seguindo o padrão anterior, com similaridade entre o controle e o tratamento com *M. incognita* + *P. lilacinus* ($p = 0.69$).

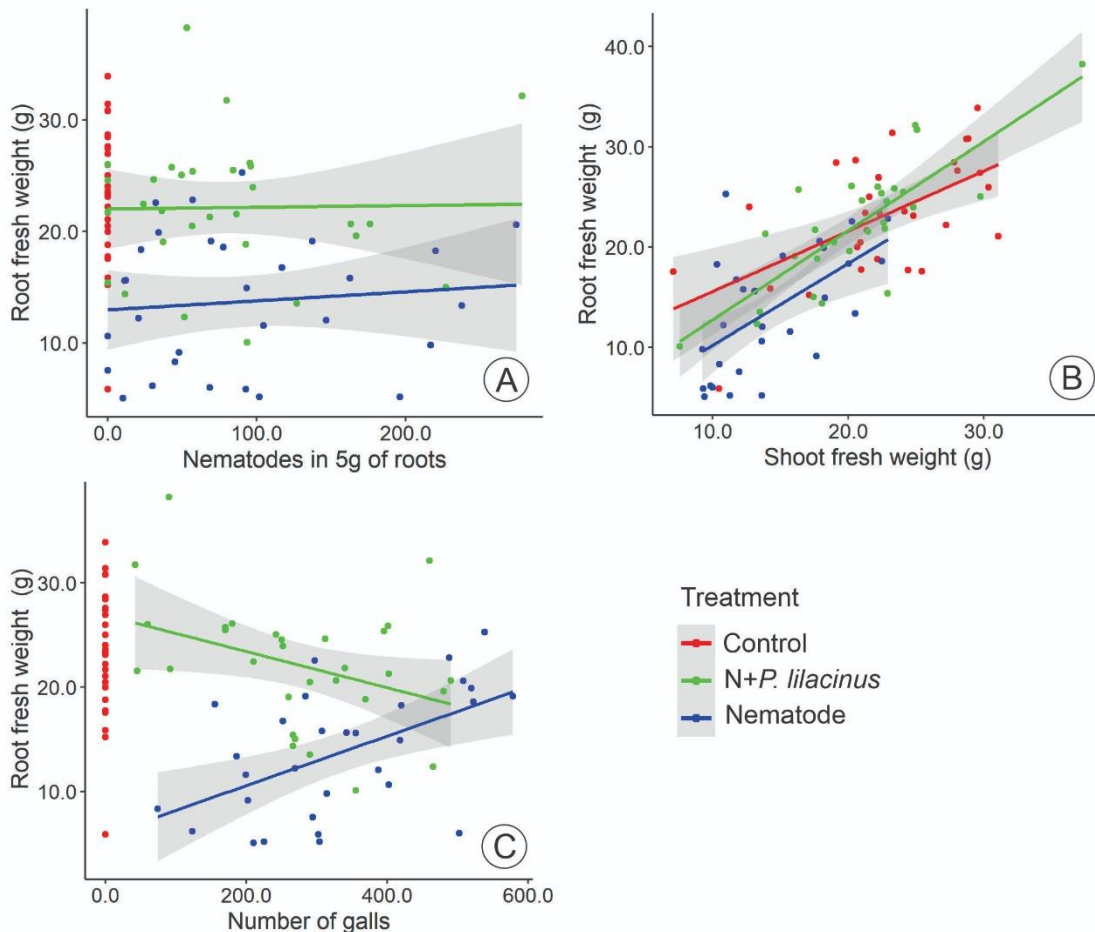
Figura 1. Regressão múltipla comparando as características agrônômicas do jiloeiro, Cultivar Comprido Verde Claro, pelos tratamentos. A- Massa fresca da raiz; B- Massa fresca da parte aérea; C- Comprimento da raiz; D- Altura da parte aérea; E- Peso seco da parte aérea. Vermelho: Controle (plantas não inoculadas); Verde: Plantas inoculadas com o nematoide (*Meloidogyne incognita*) e o fungo (*Paecilomyces lilacinus*); Azul: Plantas inoculadas apenas com o nematoide (*M. incognita*).



Nos tratamentos com *M. incognita* e *M. incognita* + *P. lilacinus* não houve aumento de massa fresca da raiz com o aumento da quantidade de nematoides em 5g de raiz (Fig. 2A; $b = 0.47$). Houve uma relação positiva entre a massa fresca da parte aérea e a massa fresca da raiz ($b = 4.4$), indicando que plantas maiores também apresentaram raízes maiores (Fig. 2B).

Também foi possível observar relação positiva entre o número de galhas com a massa fresca da raiz no tratamento apenas com o nematoide ($b = 3.41$; Fig. 2C). Isso demonstra que o aumento do número de galhas elevou a massa fresca da raiz apenas no tratamento com nematoides, contudo, houve padrão inverso para o tratamento com *M. incognita* + *P. lilacinus*, onde raízes mais leves tiveram mais galhas, e as mais pesadas menos galhas.

Figura 2. Regressão múltipla comparando peso fresco da raiz (g) com características agrônômicas do jiloeiro, Cultivar Comprido Verde Claro, dentro dos tratamentos. A- Massa fresca da raiz x nematoides em 5g de raiz; B- Massa fresca da raiz x massa fresca da parte aérea; C- Massa fresca da raiz x número de galhas. Vermelho: Controle (plantas não inoculadas); Verde: Plantas inoculadas com o nematoide (*M. incognita*) e o fungo (*Paecilomyces lilacinus*); Azul: Plantas inoculadas apenas com o nematoide (*M. incognita*).



As raízes inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus* apresentaram menor quantidade de galhas em relação às inoculadas com *M. incognita* (Tabela 2), porém indicando ainda alta susceptibilidade da cultivar de acordo com a escala de Taylor & Sasser, sendo categorizada com grau 5 (mais de 100 galhas). As plantas inoculadas apenas com *M. incognita* continham uma média de 332 galhas (74 ± 578) e as inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus*

apresentavam uma média de 274 galhas (variância de 42 ± 490). Nota-se redução na quantidade de galhas, nematoides e ovos nas raízes de plantas inoculadas com *M. incognita* + *P. linacinus* (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de galhas, ovos em 5 g de raiz, nematoides em 5g de raiz e de solo no jiloeiro, Cultivar Comprido Verde Claro, inoculado apenas com *Meloidogyne incognita* e inoculado com *M. incognita* + *Paecilomyces lilacinus*.

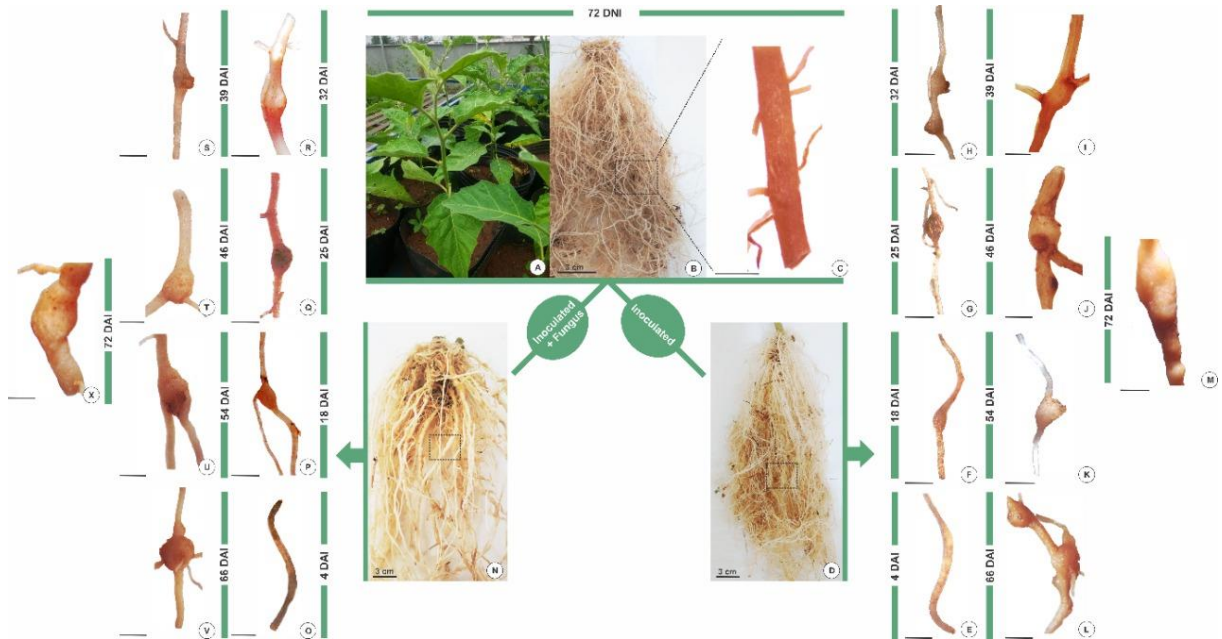
Tratamentos	Galhas	Ovos/5g raiz	Nematoides/5g raiz
<i>M. incognita</i>	332,5 ^a	640,6 ^a	91,0 ^a
<i>M. incognita</i> + <i>P. linacinus</i>	274,7 ^b	456,3 ^b	79,4 ^b
CV(%)	53,28	148,5	104,12

*Letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para a análise os dados originais foram transformados em $x^{0,5}$.

3.2 Morfologia das galhas induzidas por *M. incognita* nas raízes do jiloeiro

Aos 72 DNI, as plantas de jiló apresentavam porte herbáceo (Fig. 3A), com raízes saudáveis e sem a presença de galhas (Fig. 3B, C). Ambas as raízes oriundas de plantas inoculadas apenas com o *M. incognita* (Fig. 3D) e inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus* (Fig. 3N) apresentaram galhas. Nesses tratamentos não foi notado espessamento lateral que apontassem a formação de galhas aos 4 DAI (Fig. 3E e 3O), nem aos 11 DAI. Contudo, espessamentos laterais pequenos foram detectados aos 18 DAI (Fig. 3F e 3P), e mais conspícuos e esféricos aos 25 DAI (Fig. 3G e 3Q). Aos 32 DAI, as galhas apresentavam externamente massa de ovos (Fig. 3H) e estavam dilatadas (Fig. 3H e 3R). A partir dos 39, 46 e 54 DAI (Fig. 3I, J, K e 3S, T, U) as galhas aumentaram de tamanho, adquirindo formato irregular. Aos 66 DAI (Fig. 3L e 3V), as galhas estavam grandes, esféricas e em maior quantidade, sendo que aos 72 DAI (Fig. 3M e 3X) houve aumento em quantidade, bem como algumas estavam unidas e promovendo o intumescimento na raiz.

Figura 3. Características morfológicas do jiloeiro, Cultivar Comprido Verde Claro, não inoculado (A-C) e de suas galhas, inoculadas apenas com *Meloidogyne incognita* (D-M) e com *M. incognita* e *Paecilomyces lilacinus* (N-X).



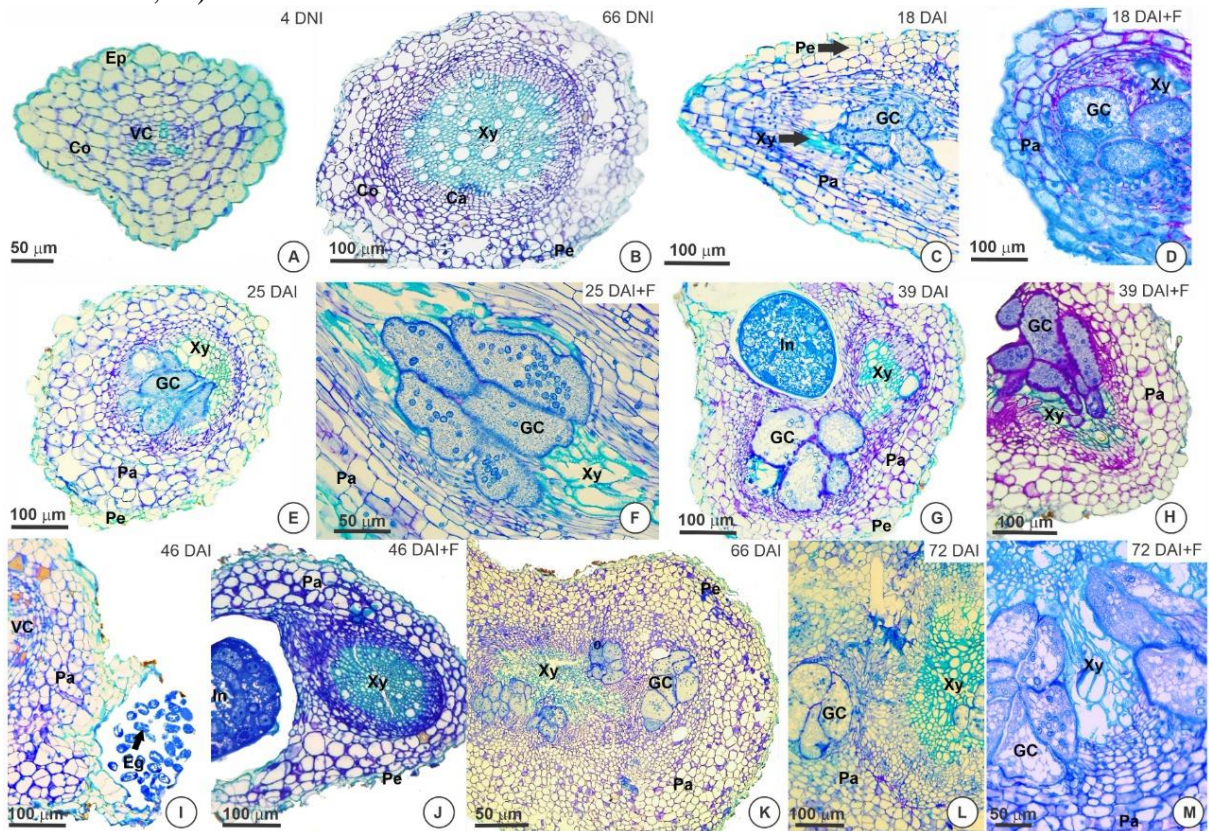
Legenda: A- Cultivar de Jiló Comprido Verde Claro em vasos; B- Sistema radicular; C- Raiz aos 72 DNI sem a formação de galhas; D, N- Sistema radicular com galhas; E, O- Raiz aos 4 DAI, sem espessamento lateral. F, P- Raiz aos 18 DAI com início do surgimento das galhas; G, Q- Presença de pequenas galhas esféricas aos 25 DAI; H- Ovos ocorrendo externamente a raiz; H, R- Galhas maiores e esféricas aos 32 DAI; I, S- Galhas aos 39 DAI, com formato irregular e maior tamanho; S- Presença de massa de ovos externamente a raiz; J, T- Galhas maiores aos 46 DAI; K, U- Manutenção da massa de ovos aos 54 DAI; L, V- Galhas esféricas, grandes e em maior quantidade aos 66 DAI; M, X- Aumento do número de galhas aos 72 DAI, com união de algumas e intumescimento da raiz.

3.3 Anatomia da raiz do jiloeiro

Aos 4 DNI, as raízes do jiloeiro apresentaram crescimento primário com epiderme unisseriada, cilindro vascular triarco e córtex com 3 a 4 camadas de tecido parenquimático (Fig. 4A). Entretanto, aos 66 DNI, a raiz apresentou crescimento secundário típico, substituição da epiderme pela periderme e surgimento do xilema secundário (Fig. 4B). Lacunas também apareceram na porção cortical do órgão (Fig. 4B). Aos 4 e 11 DAI, as raízes apresentaram estrutura anatômica similar a das raízes não inoculadas. Aos 18 DAI nota-se a formação de um sítio de alimentação, com 4 células gigantes nas raízes inoculadas apenas com *M. incognita* (Fig. 4C) e com *M. incognita* + *P. lilacinus* (Fig. 4D). Aos 25 DAI, o sítio de alimentação já estava bem formado em ambos os tratamentos com inoculação, com cerca de 5 células gigantes (Fig. 4E e 4F). As células gigantes multinucleadas, apresentavam

citoplasma denso e parede celular mais espessa (Fig. 4F). São formadas no cilindro vascular, o que promoveu a desorganização do sistema vascular (Fig. 4F).

Figura 4. Características anatômicas de raízes do jiloeiro, Cultivar Comprido Verde Claro, não inoculadas (A, B) e das galhas após inoculação apenas com *Meloidogyne incognita* (C, E, G, I, K, L) e com *M. incognita* + *Paecilomyces lilacinus* (D, F, H, J, M).



Legenda: A- Raiz não inoculada aos 4 DNI; B- Raiz não inoculada aos 66 DNI; C- Raiz inoculada aos 18 DAI, com células gigantes em formação; D- Raiz aos 18 DAI, com células gigantes bemformadas; E- Aos 25 DAI, o sítio de alimentação está bem estabelecido e com alterações no sistema vascular; F- Aos 25 DAI, células gigantes bem formadas, com núcleos evidentes, citoplasma granuloso e parede celular espessa; G- Aos 39 DAI, com fêmea de *M. incognita* próximo as células gigantes; H- Aos 39 DAI há várias células gigantes e sistema vascular desorganizado; I- Aos 46 DAI há a presença nítida da massa de ovos em massa gelatinosa; J- Aos 46 DAI nota-se a presença do indutor na câmara da fêmea; K- Aos 66 DAI existem vários sítios de alimentação e grande quantidade de células parenquimáticas; L, M- Aos 72 DAI, com detalhes das células gigantes e seus vacúolos fragmentados.

Abreviações: Co= córtex; GC= célula gigante; Ep- epiderme; Eg= massa de ovos da fêmea do nematoide; Pe= periderme; In= indutor; Pa- parênquima; Ca= câmbio vascular; Xy- xilema; VC= câmbio vascular.

Aos 39 DAI, a fêmea encontra-se globosa e próxima as células gigantes, com presença de uma massa de ovos (Fig. 4G). Nas raízes inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus* há uma maior quantidade de células gigantes (Fig. 4H). Massa de ovos estava visível também

aos 46 DAI (Fig. 4I), assim como a fêmea do nematoide (Fig. 4J). Aos 66 DAI observa-se que a periderme substitui a epiderme como tecido de revestimento, bem como há uma grande proliferação de células parenquimáticas corticais (Fig. 4K). Os sítios de alimentação também são notados aos 72 DAI em ambas as raízes inoculadas (Fig. 4L, 4M), com visível presença de vários núcleos e de vacúolos fragmentados nas células gigantes, principalmente nas galhas do tratamento *M. incognita* + *P. lilacinus* (Fig. 4M).

3.4 Imunocitoquímica

A análise imunocitoquímica para epitopos de compostos pécticos e hemicelulósicos, tanto em raízes não inoculadas aos 72 DAI e raízes inoculadas com *M. incognita* aos 25 e 72 DAI, mostrou resultados positivos a depender do tecido e estágio de desenvolvimento (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados de imunocitoquímica nas raízes do jiloeiro, Cultivar Comprido Verde Claro, não inoculadas (72 DNI) e nas galhas após inoculação (25 DAI e 72 DAI) apenas com *Meloidogyne incognita*

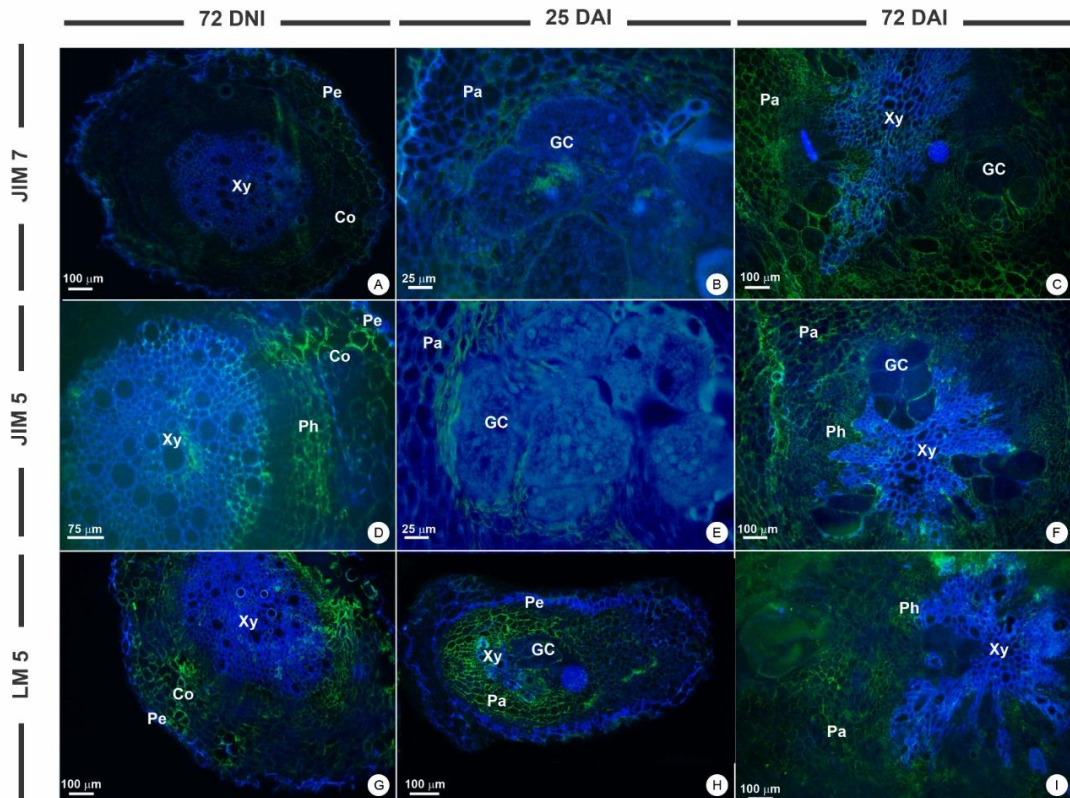
Anticorpos monoclonais	72 DNI				25 DAI						72 DAI						
	Pe	Co	Xy		Ph	Pe	Co	Xy		Ph	CG	Pe	Co	Xy		Ph	CG
			PC	Ve				PC	Ve					PC	Ve		
JIM7	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
JIM5	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
LM5	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
LM6	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
LM11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LM21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LM15	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Abreviações: Pe- periderme; Co- córtex; Xy- xilema; PC- células parenquimáticas do xilema; V- elementos de vaso; Ph- floema; GC- células gigantes.

* Resultados: (-) Negativo; (+) Positivo.

Epitopos de homogalacturonanos (HGs) metil-esterificados, reconhecidos pelo anticorpo JIM7, foram detectados no córtex no floema aos 72 DNI (Fig. 5A; Tabela 2). Aos 25 e 72 DAI, ocorreu a marcação no córtex, nas células parenquimáticas do xilema, no floema e nas células gigantes (Fig. 5B, C; Tabela 2). Epitopos de HGs com baixa metil-esterificação, reconhecidos pelo JIM5, foram marcados aos 72 DNI, no córtex de floema (Fig. 5D; Tabela 2) e marcado somente nas células parenquimáticas do xilema aos 25 DAI (Fig. 5E; Tabela 2). Enquanto aos 72 DAI ocorreu marcação no córtex, nas células parenquimáticas do xilema, no floema e nas células gigantes (Fig. 5F; Tabela 2). Epitopos de (1→4) β -D-galactano, reconhecidos pelo LM5, foram marcados aos 72 DNI, no córtex e floema (Fig. 5G; Tabela 2). E aos 25 e 72 DAI, ocorreu marcação no córtex, nas células parenquimáticas do xilema, no floema e nas células gigantes (Fig. 5H, I; Tabela 2).

Figura 5. Distribuição de homogalacturonanos, marcados por JIM7 e JIM5, e ramnogalacturonanos, marcados por LM5, em raízes de jiloeiro, Cultivar Comprido Verde Claro, não inoculadas com *Meloidogyne incognita* aos 72 DNI (A, D, G), inoculadas aos 25 DAI (B, E, H) e aos 72 DAI (C, F, I).

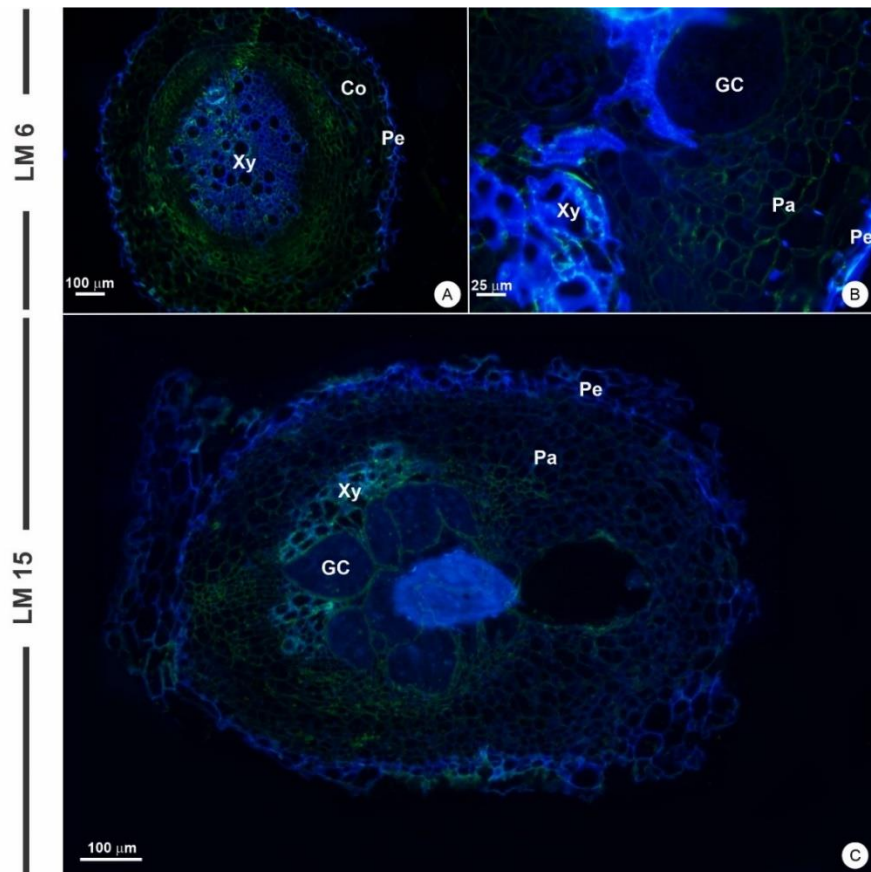


Abreviações: Co- córtex; Pe- periderme; Ph- floema; GC- células gigantes; Xy- Xxilema; Eg- ovos; In- indutor; Pa- parênquima.

Epitopos de (1→5) α -L-arabinanos, reconhecidos pelo LM6, foram detectados aos 72 DNI, no córtex e no floema (Fig. 6A; Tabela 2). Aos 25 DAI, ocorreu marcação no córtex,

nas células parenquimáticas do xilema, no floema e nas células gigantes (Fig. 6B; Tabela 2), entretanto não houve marcação aos 72 DAI. Epitopos de (1→4) - β -D-xilano/ arabinoxilano, reconhecidos por LM11 não foram detectados em nenhuma das fases (Tabela 2). Epitopos de heteromanano, reconhecidos por LM21, ocorreram apenas na periderme aos 25 DAI (Tabela 2). Epitopos de xiloglucano, marcado por LM15, foram detectados apenas aos 25 DAI no córtex, nas células parenquimáticas do xilema, no floema e nas células gigantes (Fig. 6C; Tabela 2).

Figura 6. Distribuição de epitopos pécticos, marcados por LM6, em raízes de jiloeiro, Cultivar Comprido Verde Claro, não inoculadas aos 72 DAI (A) e inoculadas com *Meloidogyne incognita* aos 25 DAI (B). Epítopos hemicelulósicos, marcados por LM15, aos 72 DAI (C).



Abreviações: Co- córtex; GC- células gigantes; Pa- parênquima; Pe- periderme; Xy- xilema.

4 Discussão

A espécie *M. incognita* induz galhas nas raízes da cultivar de jiloeiro Comprido Verde Claro, afetando o crescimento da parte aérea e ganho de massa, o que pode impactar na produtividade da cultura. As galhas e células gigantes aparecem aproximadamente aos 18 DAI e causam desorganização do cilindro vascular da raiz. A hiperplasia e a hipertrofia das células da galha ocorrem devido a alterações na estrutura e na composição pécica e hemicelulósica da parede celular, especialmente em relação a presença de ramnogalacturonanos e o grau de metil esterificação dos homogalacturonanos. O nematicida microbiológico a base do fungo *Paecilomyces lilacinus* reduziu o impacto do *M. incognita* no jiloeiro, evitando a diminuição da altura da planta e perda de massa, uma vez que atua principalmente na redução do número de ovos e de nematoides na raiz. Isso demonstra que o uso do fungo é benéfico contra infecções de *M. incognita* na cultivar de jiloeiro utilizada na presente pesquisa.

4.1 Galhas e impacto nas características agronômicas, desenvolvimento do jiloeiro

Nematoides parasitas de plantas são pragas que causam perdas de produção significativas em diversas culturas (Rossettoe Santiago 2021), com alto custo para o seu controle (Carvalho Filho 2021). Os nematoides parasitas precisam das plantas hospedeiras para completar o seu ciclo de vida (Galbieri e Belot 2016), afetando diretamente o desenvolvimento das hospedeiras. Neste trabalho, a cultivar Jiló Comprido Verde Claro é altamente susceptível aos nematoides de galhas, apresentando grau 5 (mais de 100 galhas) de acordo com a escala de Taylor & Sasser (1978), que é o índice de galhas mais utilizado no mundo (Abe 2019). Esse grau de susceptibilidade foi encontrado também em outras hortaliças como o quiabeiro infestado por *M. incognita* (Vilela et al. 2021), o pepino e o grão de bico parasitados por *Meloidogyne* spp. (Bernardes Neto et al. 2019) e na ervilha infestada com *M. javanica*, onde havia uma grande quantidade de galhas (Sharma 2000).

O grau de infestação, o número de galhas e a susceptibilidade dependem, geralmente, da planta hospedeira (Mitkowsaki e Abawi 2003). O índice de galhas é utilizado em diferentes estudos como ferramenta na caracterização da reação de genótipos de hortaliças aos nematoides de galhas, sendo que altos índices de galhas e de massa de ovos mostram a facilidade desse parasita em estabelecer o parasitismo e completar o ciclo biológico no

sistema radicular das plantas (Navarrete et al. 2016), impactando assim uma série de características agriculturáveis.

Nematoides de galhas provocam danos consideráveis na cultura do jiloeiro (Pinheiro et al. 2013), aqui também demonstradas em relação a diversas características agrônômicas. No presente estudo, a infecção do jiloeiro por *M. incognita* ocasionou a redução da altura das plantas e perda de massa fresca, o que pode ser decorrente da ação das galhas como drenos de fotoassimilados (Oliveira et al. 2016). A formação de galhas em raízes também pode causar diminuição na absorção de nutrientes e translocação de água, refletindo no crescimento da parte aérea da planta (Araújo; Bragante; Bragante 2012). Baixo vigor e reduzido desenvolvimento da parte aérea após infecção por nematoides já foram reportadas para diferentes culturas (Silva et al. 2006) como na beterraba, cultivar Oscarpoly, na qual houve redução significativa da massa fresca parte aérea e raiz (Korayem 2006) sendo relacionadas com a diminuição da produção (Ferraz; Monteiro 1995; Kran et al. 2019). As galhas induzidas por nematoides também podem reduzir o tamanho e o peso das raízes (Alves 2020), entretanto, isso não ocorreu para cultivar de jiloeiro utilizada na presente pesquisa, o que pode ser decorrente da quantidade de galhas e da proliferação de raízes secundárias (Carneiro; Mazzafera; Ferraz 1999).

A utilização do controle biológico com o fungo *P. lilacinus* demonstrou resultados surpreendentes, mantendo os parâmetros agrônômicos similares aos das plantas não inoculadas. Isso mostra que esse fungo atua de forma a aumentar a resistência da planta hospedeira a infestação pelo nematoide. Este fenômeno já foi reportado ao se utilizar o fungo *Trichoderma* spp., que elevou aumentou a resistência de plantas a estresses abióticos, melhorou a utilização de nutrientes e reforçou o crescimento, desenvolvimento e a produtividade de algumas culturas (Harman et al. 2004), no pepineiro (*Cucumis sativus* L.) isolados desse fungo promoveram o crescimento em plantas e induziram a resistência à antracnose (Silva et al, 2012).

A espécie *P. lilacinus* é um fungo do solo que vem se mostrando efetivo no biocontrole de espécies do gênero *Meloidogyne* (Santiago et al. 2006), assim como demonstrado no presente estudo. Aqui, mostramos que houve redução na quantidade de galhas, de nematoides e de ovos nas raízes com a utilização do fungo *P. lilacinus*, o que acreditamos ser devido a sua característica de penetrar nos ovos dos nematoides e destruir o embrião, além de exercer forte pressão na capacidade reprodutiva das fêmeas, que após colonizadas são mortas (Dunn et al. 1982).

Esses resultados atestam a eficiência do fungo *P. lilacinus* contra a infecção por *Meloidogyne*, permitindo que a planta hospedeira suporte melhor o parasitismo. A redução da população de *Meloidogyne* durante a infecção é uma medida efetiva de controle do número de galhas, permitindo a manutenção da densidade de nematoides abaixo do nível de dano econômico (Rusique et al. 2018).

4.2 Morfologia das galhas induzidas por *M. incognita* nas raízes do jiloeiro

A penetração dos nematoides na sua fase juvenil (J2) leva a um processo de infecção e formação das galhas (Pinheiro et al. 2010), como observado neste trabalho para ambos os tratamentos com inoculação de *M. incognita*. Este parasita desencadeia vários eventos que podem levar à indução de múltiplas galhas nas raízes, representadas por grandes grumos e inchaços (Ñino Castañeda 2015), que podem gerar o intumescimento da raiz, o que de fato ocorre no jiloeiro após 66 DAI.

Galhas induzidas por nematoides desse gênero foram relatadas em outras Solanáceas como o pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Gabia 2019), pimentas (*Capsicum* spp.) (Pinheiro; Amaro; Pereira 2012), tomate *Solanum lycopersicum* (Rusique et al. 2018; Gabia, 2019), berinjela *Solanum melongena* (Pinheiro 2016), batata (*Solanum tuberosum*) (Schafer 2017) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Bellé 2021), além de culturas pertencentes a outras famílias, como o quiabo (*Abelmoschus esculentus*) da família Malvaceae (Vilela et al., 2021), cebola (*Allium cepa*) Amaryllidaceae (Pinheiro 2021) e da família Fabaceae a soja (*Glycine max*) (Grigolli e Asmus 2014; Vilela et al. 2019; Santos et al. 2020) e o grão de bico (*Cicer arietinum*) (Vovlas et al. 2005), sendo que este apresenta morfologia semelhante as galhas induzidas no jiloeiro.

As galhas radiculares apresentam tamanhos e formas distintas (Ferraz 2001), porém, nesse estudo não apresentaram diferenças em relação a esses aspectos entre as raízes inoculadas com *M. incognita* ou com *M. incognita* + *P. lilacinus*. Contudo, as diferenças se tornaram marcantes em ambas as raízes de acordo com as épocas analisadas, apresentando-se como leve protuberância no estágio inicial, passando para um formato mais esférico na fase intermediária e chegando no estágio mais avançado unidas e com intumescimento da raiz, algo semelhante ao relatado na raiz do quiabeiro (Vilela et al. 2021). Esse aspecto de galhas alongadas e inchaço ao longo do sistema radicular pode ser devido a múltiplas infecções nas raízes desencadeada por inúmeros juvenis (Pinheiro 2014), gerando alta infecção e, consequente, fusão das galhas (Williamson e Hussey 1996).

As galhas podem ser poucas e pequenas mesmo em plantas susceptíveis, como no milho parasitado por *M. javanica*, que apresentou pequeno engrossamento nas radículas (Asmus et al. 2000). Na berinjela (Pinheiro 2016) e na pimenta, na qual as galhas são bem menores se comparadas com as de outras hortaliças, como o tomateiro (Pinheiro; Amaro; Pereira 2011) que quando parasitado por *M. incognita* tem galhas maiores e com formato irregular (Pinheiro et al. 2014). Na soja (Grigolli e Asmus 2014) e no tabaco (Heller et al. 2019), as galhas nas raízes têm tamanhos e quantidade variados, dependendo da densidade populacional do nematoide e da suscetibilidade da cultivar (Bellé 2021), que são fatores importantes que influenciam na quantidade de galhas, juntamente com outros aspectos como a espécie de *Meloidogyne* e da planta hospedeira (Rusique et al. 2018).

O ciclo do nematoide de galhas normalmente ocorre de 3 a 4 semanas (Ferraz e Monteiro 1995), sendo que para as galhas do jiloeiro na quarta e na quinta semana já era visível a massa de ovos externamente. Na cebola, a massa de ovos foi observada mesmo quando as galhas ainda não eram visíveis (Pinheiro 2021) e na pimenta se apresentavam com coloração marrom claro (Pinheiro; Amaro; Pereira 2011). Esta massa gelatinosa é composta de uma matriz de glicoproteínas e são macias, pegajosas e hialinas, ficando mais firmes e escuras com o passar do tempo (Moens et al. 2009).

Cada fêmea produz cerca de 500 ovos em uma massa gelatinosa (Agrios 2005). Após uma primeira muda no ovo, os juvenis de segundo estágio eclodem do ovo no solo e normalmente reinfectam a mesma planta hospedeira (Bird e Kaloshianb 2003), o que pode explicar uma maior quantidade de galhas nos últimos dias após a inoculação analisadas no jiloeiro. Presentes na maioria das interações, as galhas induzidas por *Meloidogyne* não são sintomas obrigatórios, podendo estar ausentes em raízes de algumas plantas, como no cafeeiro infectado por *M. coffeicola* (Ferraz e Brown 2006). As células gigantes são fundamentais para o desenvolvimento e reprodução do nematoide, porém as galhas não são (Tihohod 2000). Entretanto é um dos principais sintomas da infestação por esse parasita.

4.3 Anatomia da raiz e desenvolvimento das galhas no jiloeiro

O nematoide de galhas estabelece e mantém uma relação íntima com a planta hospedeira durante o parasitismo (Rusique 2018) e, quando bem-sucedido, é caracterizado pela formação de células gigantes altamente específicas, induzidas e mantidas pelas fêmeas desse parasita (Mukhtar 2020).

As células gigantes se desenvolvem por meio do estímulo recebido das secreções de glândulas esofagianas que possuem reguladores de crescimento, que também ocasionam hipertrofia e hiperplasia de células proximais e, conseqüentemente, levam a formação de galhas (Mitkowski e Abawi 2003). Desta forma, a formação de células gigantes associadas a hipertrofia e a hiperplasia principalmente de células parenquimáticas foram os principais eventos que caracterizaram a formação das galhas no jiloeiro.

As células gigantes estavam presentes tanto nas raízes inoculadas com *M. incognita* quanto nas inoculadas com *M. incognita* + *P. lilacinus*, sugerindo então que o fungo não interferiu na formação do sítio de alimentação da galha. O *P. lilacinus* é conhecido pela colonização e morte das fêmeas (Dunn et al. 1982), o que não ocorreu nas raízes analisadas, visto que os sítios de alimentação ainda estavam bem estabelecidos aos 66 e 72 DAI.

Os sítios de alimentação já estavam presentes em espécies de *Arachis* induzidas por *M. arenaria* aos 15-19 DAI (Proite 2008). No quiabeiro, aos 11 DAI já era possível observar sítios de alimentação com mais de 4 células gigantes em todos os estágios (Vilela et al. 2021), algo que ocorreu no jiloeiro após os 18 DAI. Em goiabeira (*Psidium guajava* L.), cultivar Paluma, parasitadas por *M. enterolobii*, as células gigantes foram observadas a partir dos 17 DAI, com fêmeas adultas ao lado destas células notadas aos 27 a 31 DAI (Freitas 2012).

No jiloeiro, as fêmeas foram notadas próximas ao sítio de alimentação aos 39 DAI, mostrando-se em formato globoso, como é o usual (Mitkowski e Abawi, 2003). Em batateira, cultivar Cara, infestadas por *M. javanica*, observou-se que cada fêmea adulta estava rodeada por três a seis grandes células gigantes com paredes celulares espessadas, citoplasma granulado e numerosos núcleos (Vovlas et al. 2005), características celulares essas similares ao encontrado nas células gigantes das galhas de soja parasitas por *M. javanica* (Vilela et al. 2019), bem como para o jiloeiro a partir dos 25 DAI. As células gigantes são geralmente multinucleadas, o que possibilita alta produção de proteínas que podem ser utilizadas na alimentação do nematoide (Mitkowski e Abawi 2003). Além disso, o jiloeiro apresentou múltiplos vacúolos fragmentados aos 72 DAI, assim como já relatado para goiabeira a cv. Paluma (Freitas 2012).

Estudos anatômicos com foco na formação e na estrutura das células gigantes e nas alterações na estrutura radicular tem sido desenvolvidos (Asmus et al 2000; Proite 2008; Westerich et al. 2012; Palomares-Rius, et al. 2017 Vilela et al. 2019; Vilela et al. 2021) e vem trazendo informações úteis para se compreender melhor a relação parasita- hospedeiro, bem como os danos causados pelos nematoides de galhas em culturas susceptíveis.

O desenvolvimento das galhas do jiloeiro se iniciou dentro do cilindro vascular, como já relatado para outras culturas (Escobar et al. 2015), promovendo desorganização do sistema vascular e possível compressão ou até mesmo obliteração de elementos de vaso do xilema, o que já foi relatado também no milho parasitado por *M. javanica* (Asmus et al. 2000). Esse comprometimento do sistema vascular radicular pode interferir no fluxo de seiva e no desenvolvimento da planta, inclusive do jiloeiro, afetando a produtividade vegetal.

Aqui destacamos que o impacto negativo nos parâmetros agrônômicos desencadeados pela infecção de *M. incognita* no jiloeiro pode ter relação direta com as profundas modificações anatômicas aqui reportadas. A formação das galhas no jiloeiro também foi marcada por alto e expressivo processo de hiperplasia das células parenquimáticas corticais da raiz, sendo o principal fator que promoveu crescimento em espessura da galha, algo também relatado para galhas de soja induzidas por *M. javanica* (Vilela et al. 2019) e do quiabeiro induzidas por *M. incognita* (Vilela et al. 2021).

4.4 Dinâmica da parede celular durante a formação da galha e sítios de alimentação

O uso de anticorpos monoclonais para detecção de compostos de parede celular tem sido utilizado para compreensão de aspectos funcionais durante o desenvolvimento de galhas de insetos (Formiga et al. 2013, Oliveira et al. 2014, Carneiro et al. 2015; Martini et al. 2019) e, mais especificamente, em galhas induzidas por nematoides (Bozbuga 2017; Meidani et al. 2019; Vilela et al. 2021). Apesar de estudos recentes com estes microrganismos, ainda pouco se sabe sobre a dinâmica na formação das células gigantes e do alongamento das células do córtex para formação de suas galhas. Na presente pesquisa a indução das galhas do jiloeiro promoveu elevada mudança na composição das paredes celulares dos tecidos das raízes, com surgimento de novos epitopos pécticos e hemicelulósicos ao longo do desenvolvimento das galhas.

As pectinas são polissacarídeos abundantes em ácido galacturônico e encontram-se distribuídos em três classes: ramnogalacturonanos I (RG-I), ramnogalacturonanos II (RG-II) e homogalacturonanos (HGs) (Ridley et al. 2001; Willats et al. 2001; Albersheim et al. 2011). Os homogalacturonanos (HGs), reconhecidos pelo anticorpo monoclonal JIM5, se ligam a epitopos presentes em polímeros de HG relativamente não esterificados, enquanto o JIM7 a HGs de esterificação moderada a alta (Knox et al. 1990; Willats et al. 2000). Esse grau de esterificação está relacionado a diferentes funcionalidades das paredes celulares, com ganho

de flexibilidade com os HGs altamente metilesterificados e de rigidez com os HGs não-metilesterificados (Knox et al. 1990; Willats et al. 2000; Sabba e Lulai 2005).

As raízes não inoculadas de jiloeiro apresentaram córtex e floema com diferentes níveis de metilesterificação. Após inoculação, as galhas jovens, aos 25 DAI, apresentaram predominância de HGs altamente metilesterificadas, inclusive nas células gigantes, sendo as paredes celulares demetilesterificadas com o desenvolvimento final das galhas, aos 72 DAI. Isso demonstra um investimento inicial em extensibilidade das células na formação dos sítios de alimentação e das galhas do jiloeiro, com subsequente enrijecimento celular final.

No milho, os HGs metilesterificados, galactano, arabinogalactano e xiloglucanos estavam em abundância nas paredes das células gigantes induzidas por nematoides, enquanto HGs com baixa metilesterificação foram marcados com maior frequência no último estágio da raiz inoculada (Bozbuga, 2017), seguindo o padrão encontrado neste trabalho. No quiabeiro, Vilela et al. (2021) sugerem que a síntese e a desmetilação das paredes celulares das células gigantes e do parênquima do xilema podem aumentar a porosidade e, assim, a troca de nutrientes com os nematoides de galhas.

Os epítomos de (1→5)- α -L-arabinanos, reconhecidos pelo LM6, tem relação com a adesão de células e geralmente estão associados com a diminuição da capacidade de expansão celular (Brummell et al. 2004). Esses epítomos não foram marcados nas galhas maduras do jiloeiro, aos 72 DAI, estando bem representados nas galhas jovens, aos 25 DAI. Ao mesmo tempo, houve uma sobreposição na marcação dos tecidos das galhas jovens pelo LM6 e pelo LM5, que reconhece os epítomos de (1 → 4)- β -D-galactanos. Os epítomos marcados pelo LM5 permitem que a parede celular se expanda e alongue (McCarley et al. 2003), algo esperado para os tecidos jovens das galhas do jiloeiro aos 25 DAI. A sobreposição com a marcação do LM5 e LM6 pode, então, demonstrar uma função associada entre expansão e adesão ao longo do desenvolvimento das galhas do jiloeiro.

Epítomos de xiloglucanos, reconhecidos pelo LM15, tem papel essencial na regulação da expansão da parede celular (Cosgrove 1999; Carpita 1996), auxiliando no seu alongamento e crescimento (Pauly et al. 2013). Esses epítomos foram marcados na galha jovem, aos 25 DAI, e ausentes nos demais estágios maduros, com e sem inoculação, o que reforça o seu papel na formação e desenvolvimento da parede celular dos tecidos da galha de jiloeiro, inclusive da própria célula gigante.

5 Conclusão

- i) O *M. incognita* prejudica o desenvolvimento do jiloeiro, cultivar Comprido Verde Claro, que apresenta menor altura e peso da parte aérea, bem como redução do peso da raiz.
- ii) As plantas inoculadas com *P. lilacynus* suportam melhor o parasitismo visto que não houve redução em nenhum dos parâmetros agronômicos, e ainda promovem redução na quantidade de nematoides e de ovos nas raízes.
- iii) Células gigantes e galhas ocorrem aos 18 DAI em ambas as raízes inoculadas, sendo a cultivar classificada como altamente susceptível.
- iv) O desenvolvimento das galhas de jiloeiro foi mediado pela demetilesterificação das paredes celulares, associado com a marcação de epítomos de (1→4)- β -D-galactanos, (1→5)- α -L-arabinanos e xiloglucanos que criam equilíbrio entre adesão e flexibilidade necessário ao desenvolvimento das células gigantes e dos demais tecidos da galha.

Referências

- Abe VHF, Miamoto A, Felinto AS, Peres FO, Dias-Arieira CR (2019) Automated Counting of *Meloidogyne javanica* Galls in Vegetable Roots. *Summa Phytopathologica*, 45 (4)381-386.
- Agrios G (2005) *Plant pathology*. 5th ed. Burlington: Elsevier Academic Press, pp. 952.
- Alcantara HP, Porto FG (2019) Influência de fertilizante foliar com aminoácidos na cultura do jiló. *Brazilian Journal of Development*. 5 (6): 5554-5563.
- Almeida AMR. et al. (2005) Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. *Manual de fitopatologia* São Paulo: Agronômica Ceres, pp. 569-588.
- Alves FR, Freitas LG (2014) Controle biológico de fitonematoides. O essencial da fitopatologia, controle de doenças de plantas. Viçosa, MG: Ed.UFV, pp. 235-264.
- Alves MVP (2016) Caracterização física e fisiológica de sementes de jiló (*Solanum grilo*) em diferentes estádios de desenvolvimento. 103 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Lavras-MG: UFLA.
- Aphortesp - Associação dos Produtores e Distribuidores de Hortifruti do Estado de São Paulo, 2013. <http://www.aphortesp.com.br/index.html>. Acessado em 15 nov 2021.
- Araújo FF, Bragante RJ, Bragante CE (2012) Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. *Pesq. Agropec. Trop*, 42 (2): 220-224. e-ISSN 1983-4063.
- Asmus GL, Ferraz LCCB, Appezato BG (2000) Alterações anatômicas em raízes de milho (*Zea mays* L.) parasitadas por *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 30: 33-39.
- Bakhetia M, Charlton W, Atkinon Hj. & Mcpherson MJ (2005) RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interact* 10: 1099-106.
- Ballagro 10. Nemat: único nematicida microbiológico registrado no Brasil. <http://nematologia.com.br/files/uploads/2014/10/nemat14.pdf>. Acessado em 20 nov 2021.
- Barbosa MV, Pedroso DF, Pinto FA, Santos JV, Carneiro MAC (2019) Fungos micorrízicos arbusculares e *Urochloa brizantha*: simbiose e multiplicação de esporos. *Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)*, 49, p.e54530-e54530.
- Belle C (2021) Nematoides na cultura do tabaco. Disponível em: <https://iphytus.com/nematoides-no-tabaco/>. Acessado em 10 nov 2021.
- Bernard GC, Egnin M, Bonsi C (2017) The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control. In: *Nematology: concepts, diagnosis and control*. (Eds). doi:10.5772/intecoen68958.
- Birda DMcK, Kaloshianb I (2003) Are roots special? Nematodes have their say *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:115–123.

Bozbuga R, Lilley CJ, Knox, JP et al. (2018) Host-specific signatures of the cell wall changes induced by the plant parasitic nematode, *Meloidogyne incognita*. Sci Rep 8, 17302. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35529-7>

Bozbuga, Refik (2017) Characterisation of cell walls at the feeding site of *Meloidogyne incognita*. PhD thesis, University of Leeds.

Brummell DA, Dal Cin V, Crisosto CH, Labavitch JM (2004) Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. Journal of Experimental Botany 55: 2029–2039.

Caillaud MC. et al. (2008) Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. J. Plant Physiol. 165: 104–113.

Carneiro RG, Ferraz LCCB, Mazzafera P (1999) Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. Journal of Nematology, Lake Alfred, 31: 348-355.

Carneiro RGS, Isaias RMS (2015) Gradients of metabolite accumulation and redifferentiation of nutritive cells associated with vascular tissues in galls induced by sucking-insects. AoB Plants 7: plv086.

Carpita NC (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 445- 476.

Campos VP, Sivapalan P, Gnanapragasam NC (1990). Nematode parasites of coffee, cocoa, and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. (eds.). London: Cab International. pp. 113-126.

Campos VP (1997). Controle de doenças: Doenças causadas por nematoides In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.). Controle de Doenças de Plantas. Viçosa. UFV. 1: 141- 179.

Cares JE, Blum LEB, Andrade EP Nematologia vegetal: uma introdução. In: BLUM, L.E.B. O estudo das doenças de plantas. Brasília: Ed Otimismo, 206 Pág 258.

Carvalho Filho MR (2021) Interação planta-nematoide: entender para conviver. <https://jrobioproductos.com.br/2021/04/23/interacao-planta-nematoide-entender-para-conviver/>. Acessado em 20 dez 2021.

Coolen WA, D’Herde CJ (1972). A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. Ghent, Bélgica. State Nematology and Entomology Research Station, ps. 77.

Cosgrove DJ (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 391–417.

Defilippi BG. et al. (2018) Changes in cell wall pectins and their relation to postharvest mesocarp softening of “Hass” avocados (*Persea americana* Mill.). Plant Physiology and Biochemistry, 128: 142–151.

Dunn MT et al. (1982) Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. *Scanning Electron Microscopy*, pp.1351-1357.

Djian-Caporalino, C (2012) Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), a growing problem in French vegetable crops. *EPPO Bull.* 42: 127–137.

Dong LQ, Zhang KQ (2006) Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant Soil*, The Hague, 288 (1-2):31-45.

Feder N, O'Brian TP (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am J Bot* 55: 123-142.

Galbieri R, Belot JL (Eds.) (2016) Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. Cuiabá-MT: Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt. <https://earth.google.com/web/>. Acessado em 06 jun 2021.

Hamann T (2012) Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 3 (77).

Heller E, Neuschank E, Calsin CPM, Santolin LD, Gomes CB (2019) Caracterização bioquímica de espécies dos nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) em tabaco. XXVII CIC Congresso de Iniciação científica. https://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2019/CA_03133.pdf.

Escobar C, Barcala M, Cabrera J, Fenoll C (2015) Overview of root-knot nematodes and giant cells. *Adv. Bot. Res.* 73: 1–32.

Fao & Who (2016) International Code of Conduct on Pesticide Management Guidelines on Highly Hazardous Pesticides. www.fao.org/publications. Acessado em 12 dez 2021.

Ferraz CCB, Monteiro AR (1995) Nematoides. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L. (Ed.). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1: 168-201.

Ferraz LCCB (2001) As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. 40 V. (Org.). *Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja*. Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, pp. 15-38.

Ferraz LCCB, Brown DJF (Orgs) (2016) *Nematologia de plantas: fundamentos e importância*. Manaus-AM: Norma Editora, ISBN: 978-85-99031-26-1.

Ferreira DF (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 6 (2): 36-41.

Freitas VM de (2012) Resistência genética de goiabeira e reação de espécies frutíferas visando o manejo de *Meloidogyne enterolobii*. 92 p. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

Formiga AT, Oliveira DC, Ferreira BG, Magalhães TA, Castro AC, Fernandes GW, Isaias RMS (2013) The role of pectic composition of cell walls in the determination of the new

shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). *Protoplasma* 250: 899-908.

Galbieri R, Belot JL (Eds.) (2016) Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. Cuiabá-MT: Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt.

Gomes CB, Souza RM (2003) Doenças causadas por nematoides, In: O cultivo da batata na região Sul do Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, pp. 321-349.

Grigolli JFJ, Asmus GL (2014) Manejo de Nematoides na cultura da Soja. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/985986/1/cap.9.pdf>. Acessado em 21 dez 2021.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (1): 43-56.

Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM. 2008. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. *Current Biology* 18, 730-734.

Hernandez Gomez MC, Rydahl MG, Rogowski A, Morland C, Cartmell A, Crouch L, Labourel A, Fontes CM, Willats WG, Gilbert HJ, Knox JP (2015) Recognition of xyloglucan by the crystalline cellulose-binding site of a family 3a carbohydrate-binding module *FEBS Lett*, 589(18):2297-303.

Jorge DM, Souza CAV (2017) O Papel da Regulamentação dos Produtos de Origem Biológica no Avanço da Agroecologia e da Produção Orgânica no Brasil. In: Jorge, D.M.; Souza, C. A. V. (eds.). A política nacional de agroecologia e produção orgânica no Brasil: uma trajetória de luta pelo desenvolvimento rural sustentável. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), pp. 147–194.

Kerry BR (1990) An assessment of progress toward microbial controle of plant parasitic nematode. *Journal of Nematology*, 22 (45): 621-631 (Supplement).

Knox JP (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology* 171: 79–120.

Knox JP, Linstead, PJ, King J, Cooper C. Roberts K (1990) Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta*. 181: 512-521.

Korayem AM (2006) Relationship between *Meloidogyne incognita* density and damage to sugar beet in sandy clay soil. *Egypt Journal Phytopatology*, 34: 61-68.

Koenning SR, Wrather JA, Kirkpatrick TL, Walker NR, Starr JL, Mueller, JD (2004) Plant-parasitic nematodes attacking cotton in the United States: Old and emerging production challenges. *Plant Dis*. 88: 100–113.

Kofoid CA, White WA (1919) A new nematode infection in man. J Amer. Med. Assoc, 72: 567-569.

Kran CS (2019) Produção e qualidade de sementes de jiló sob o parcelamento da adubação de cobertura. 23 f. Monografia (Graduação em Agronomia). Ceres-GO: IFG.

Lana MM, Tavares SA (Ed.) (2010) 50 Hortaliças: como comprar, conservar e consumir. 2. ed. rev. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 209 p. il. Color.

Marcus SE, Verhertbruggen Y, Herve C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, et al. (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. BMC Plant Biol. 8:60. doi: 10.1186/1471-2229-8-60.

Li Y, McQueen-Mason LJS (2003) Expansins and cell growth. Curr Opin Plant Biol. 6: 603-610. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.09.003>.

Meidani C, NtallinG, Giannoutsou E, Adamakis SID (2019) Cell Wall Modifications in Giant Cells Induced by the Plant Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita* in Wild-Type (Col-0) and the fra2 Arabidopsis thaliana Katanin Mutant. Int. J. Mol. Sci. 20: 5465. <https://doi.org/10.3390/ijms20215465>.

McCartney L, Steele-King CG, Jordan E, Knox P (2003) Cell wall pectic (1-4)- β -D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. Plant J. 33: 447-454.

Mitkowski NA, Abawi GS (2003) Nematode de galhas. The PlantHealth Instructor, EUA.

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M; STARR, J. L. (Ed). Root knot nematodes. Wallingford, UK, CAB International, pp. 1-17.

Mukhtar T, Kayang MZ (2020) Comparison of the damaging effects of *Meloidogyne incognita* on a resistant and susceptible cultivar of cucumber. Bragantia 79 (1): 83-93 DOI:10.1590/1678-4499.20190359.

Navarrete M., Djian-Caporalino, C., Mateille, T. et al. A resistant pepper used as a trap cover crop in vegetable production strongly decreases root-knot nematode infestation in soil. Agron. Sustain. Dev. 36, 68 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0401-y>.

Neres CRL, Vieira G, Diniz ER, Mota WF, Puiatti M (2004) Conservação do jiló em função da temperatura de armazenamento e do filme de polietileno de baixa intensidade. Bragantia, 63 (3): 431-438 DOI: 10.1590/S0006-87052004000300013.

Niño Castañeda NE (2015) Estudo da interação *Musa acuminata-Meloidogyne incognita*. 267 f., il. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade de Brasília, Brasília.

Nühse TS (2012) Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants Front. Plant Sci., 3 (480): 1-5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00280>.

Odetola AA, Iranloye YO, Akinloye O (2004) Hypolipidaemic potentials of *Solanum melongena* and *Solanum gilo* on hypercholesterolemic rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (3): 180-187.

Oliveira DP (2016) Identificação de raças fisiológicas de *Meloidogyne javanica* e *M. arenaria* parasitas em plantas de soja na Região do Distrito Federal e Entorno. Monografia de graduação em agronomia. Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV.

Oliveira DC, Isaias RMS, Fernandes GW, Ferreira BG, Carneiro RGS, Fuzaro L (2016) Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology* 84: 103- 113. 9 Raman A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92: 748-757.

Oliveira DC, Magalhães TA, Ferreira BG, Teixeira CT, Formiga AT, Fernandes GW, Isaias RMS (2014) Variation in the degree of pectin methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall, *Plos One* 9: e94588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094588>.

Onkendi EM, Kariuki GM, Marais M, Moleleki LN (2014) The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: A review. *Plant Pathol.* 63: 727–737.

Palomares-Rius JE, Escobar C, Cabrera J, Vovlas A, Castillo P (2017) Anatomical Alterations in Plant Tissues Induced by Plant-Parasitic Nematodes. *Front Plant Sci.* 8 (1987) doi: 10.3389/fpls.2017.01987. PMID: 29201038; PMCID: PMC5697168.

Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta.* 38 (4): 627-42. doi: 10.1007/s00425-013-192. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23801299.

Pinheiro JB, Carvalho ADF, Vieira JV (2010) Manejo do nematoide- das- galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivos de cenoura na região de Irecê – BA. Brasília, DF. Embrapa Hortaliças (Comunicado Técnico 77).

Pinheiro JB, Amaro GB, Pereira RB (2012) Nematoides em pimentas do gênero *Capsicum*. Brasília: EMBRAPA. 9p (Circular técnica, 104).

Pinheiro JB, Pereira, RB, Carvalho, AD Fde, Aguiar FM (2013) Ocorrência e manejo de nematoides na cultura do jiló e berinjela. Embrapa (Circular técnica, 125).

Pinheiro JB, Pereira RB, Suinaga FA (2014) Manejo de nematoides na cultura do tomate. Embrapa Hortaliças (Circular técnica, 132).

Pinheiro JB, Pereira, RB, Freitas RA de, Melo RA de C (2015) A cultura do jiló. Embrapa, 70p. (Coleção Plantar, 75).

Pinheiro JB (2016) Controle de doenças de solo no cultivo da berinjela. <https://revistacampoenegocios.com.br/controle-de-doencas-de-solo-no-cultivo-da-berinjela/>. Acessado em 12 dez 2021.

Pinheiro JB. *Árvore do Conhecimento: Pimenta: Nematoides*. <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn0k9bx902wx5ok01iq1mqut1365k.html>. Acessado em 15 dez 2021.

Pinheiro JB (2021) Nematóide-das-galhas. Cebola. <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacaotecnologica/cultivos/cebola/producao/doencas/campo/nematoides/nematóide-das-galhas>. Acessado em 15 dez 2021.

Proite K, Carneiro R, Falcão R, Gomes A, Leal-Bertioli S, Guimarães P, Bertioli B (2008) Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis spp* Plant Pathology 57: 974–980 doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01861.x

R Core Team, R: A language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (2020).

Rossetto R, Santiago AD. *Árvore do conhecimento cana-de-açúcar. Nematoides*. https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeaacucar/arvore/CONTAG01_54_711200516718.html. Acessado 03 dez 2021.

Ridley BL, O'Neill MA, MohnenD (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide related signaling. *Phytochemistry* 57:929-967.

Rusinque L, Lurdes Inácio M, Mota M, Nóbrega F (2018) Morphological, biochemical, and molecular characterisation of *Meloidogyne javanica*, from North Portugal, in tomato *Revista de Ciências Agrárias*, 41(1): 193-198.

Sabba, RP, Lulai, E (2005) Immunocytological analysis of potato tuber periderm and changes in pectin and extension epitopes associated with periderm maturation, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130: 936-942.

Santos HG, Jacomine PKT, Anjos LHC, Oliveira VA, Lumbreras JF, Coelho MR, Almeida, JA, Araújo Filho JC, Oliveira JB, Cunha, TJF. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. 5. ed., rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2018. 356p

Santos P, Lopez A, Rebelato G, Frigo M, Instituto Phytus; Serafini PT, Zuhl J (2020) Reação de cultivares de soja a nematoides das galhas. ed. 203. <https://revistacultivar.com.br/artigos/reacao-de-cultivares-de-soja-a-nematoides-das-galhas-ed-203>. Acessado 03 dez 2021.

Santiago DC, Homechin M, Silva JFV, Ribeiro ER, Gomes BC, Santoro PH (2006) Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. *Defesa Fitossanitária. Cienc. Rural* 36 (4). <https://doi.org/10.1590/S010384782006000400003>

Schafer JT, Gomes CB, Pereira A da S, Cruz FF, Barros DR de (2017) Reação de genótipos de batata a *Meloidogyne javanica*. *Rev. Caatinga* 30 (2). <https://doi.org/10.1590/198321252017v30n230rc>

Silva MG, Sharma RD, Junqueira AMR, Oliveira CM (2006) Efeito da solarização, adubação química e orgânica no controle de nematoides em alface sob cultivo protegido. *Horticultura Brasileira*, 24: 489-494.

Sharma RD, Silva JE, Resck DVS, Gomes AC (2000) Dinâmica de população de fitonematoides em solo tratado com lodo de esgoto em cultivos de milho. *Nematologia Brasileira* 24: 37-40.

Singh SP, Montgomery BL (2011) Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends Microbiol.* 19, 278–285. doi: 10.1016/j.tim.2011.03.001

Silva VN da, Guzzo SD, Lucon CMM, Harakava R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* [online]. 2011, v. 46, n. 12 [Acessado 16 janeiro 2022], pp. 1609-1618. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001200005>>. Epub 01 Fev 2012. ISSN 1678-3921.

Szymanski DB (2009) Plant cells taking shape: new insights into cytoplasmic control. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 735–744. doi: 10.1016/j.pbi.2009. 10.005

Taylor AL, Sasser JN (1978) Biology, identification, and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* species). NCSU & USAID Coop Publ, Raleigh.

Tihohod D (2000) *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal: Funep, 372 p.

Vovlas, N. et al. (2005) Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathology*, London, 24 (5): 657-664.

Vilela RMIF, Martini VC, Gonçalves L d A, Kuster VC, Oliveira DC (2019) Structure and development of root gall induced by *Meloidogyne javanica* in *Glycine max* L. *Semina: Série botânica* 40:1033–1048. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n3p1033>

Vilela RMIF, Kuster VC, Magalhães TA, Moraes CA, de Paula Filho AC, de Oliveira DC (2021) Impact of *Meloidogyne incognita* (nematode) infection on root tissues and cell wall composition of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench, Malvaceae). *Protoplasma.* 258(5): 979-990. doi: 10.1007/s00709-021-01618-0. Epub 2021 Feb 2. PMID: 33532872.

Ye W, Robbins RT & Kirkpatrick T (2019). Molecular characterization of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from Arkansas, USA. *Scientific Reports*, 9(1): 1-21.

Westerich JN, Rodella RA, Rosa JMO, Wilcken SRS (2012) Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (*M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. *Summa Phytopathologica, Botucatu*, 38 (3): 192-197.

Willats WG, Limberg G, Buchholt HC, Van Alebeek, GJ, Benen J, Christensen TM, Knox JP (2000) Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* 327(3): 309-320.

Willats WGT, McCartney L, Mackie W (2001) Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47:9–27. <https://doi.org/10.1023/A:1010662911148>

Williamson VM, Hussey RS (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*, Rockville, 8: 1735-1745.

Wolf S, Greiner S (2012) Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249:169–175.
<https://doi.org/10.1007/s00709-011-0371-5>

Apêndice 1

Anticorpos monoclonais e epitopos utilizados para a marcação de compostos pécnicos e hemicelulósicos.

Anticorpo Monoclonal	Epitopos	Referências
Pectins/ Homogalacturonan (HG)		
JIM 5	partially Me- HG/ no ester	VanderBoshet al. (1989); Knox et al. (1990); Willats et al. (2000); Clausen et al. (2003)
JIM 7	partially Me- HG	Knox et al. (1990); Willats et al. (2000); Clausen et al. (2003)
Pectins/Rhamnogalacturonan-I		
LM 5 (1 ->4)	β - D galactan	Jones et al. (1997); Willats et al. (1999); Orfila e Knox (2000)
LM 6 (1 ->5)	α - L- arabinan	Willats et al. (1999); Orfila e Knox (2000)
Hemicellulose		
Heteroxylan		
LM 11(1 ->4)	β - D Xylan/arabinoxylan	McCartney et al (2005)
LM 21	heteromannan	Marcus et al (2010)
LM 15	XXXG motif of xyloglucan	Marcus et al (2008)