



LARISSA FERNANDA ANDRADE SOUZA

**CHAMADA À DISTÂNCIA: QUIMIOTAXIA DE *Meloidogyne javanica* A COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EMITIDOS
POR RAIZ DE SOJA**

**LAVRAS – MG
2022**

LARISSA FERNANDA ANDRADE SOUZA

**CHAMADA À DISTÂNCIA: QUIMIOTAXIA DE *Meloidogyne javanica* A
COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EMITIDOS POR RAIZ DE SOJA**

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

**Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador.**

LARISSA FERNANDA ANDRADE SOUZA

**CHAMADA À DISTÂNCIA: QUIMIOTAXIA DE *Meloidogyne javanica* A
COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EMITIDOS POR RAIZ DE SOJA**

**DISTANCE CALL: CHEMOTAXY OF *Meloidogyne javanica* TO VOLATILE
ORGANIC COMPOUNDS EMITTED BY SOYBEAN ROOT**

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

Aprovada em 11 de fevereiro de 2022.
Dr. Márcio Pozzobon Pedroso DQI/UFLA
Dr. Eduardo Souza Freire DFP/UniRV



Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
Chefe do Lab. de Nematologia
Departamento de Fitopatologia UFLA

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador.

**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).**

Andrade-Souza, Larissa Fernanda.

Chamada à distância: Quimiotaxia de *Meloidogyne javanica* a compostos orgânicos voláteis emitidos por raiz de soja / Larissa Fernanda Andrade-Souza. - 2022.

51 p.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Fitonematoides. 2. Quimiotaxia. 3. Aleloquímicos. I. Campos, Vicente Paulo. II. Título.

Eu dedico esta dissertação a minha Mãe Nilza e em memória ao meu Pai José por todo o amor, carinho e suporte.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a oportunidade de ter paciência, fé, coragem e ser resiliente.

Aos meus pais e a minha família em geral por todo o apoio que me deram ao longo dos meus estudos e vida.

Ao meu orientador PhD. Vicente Paulo Campos por ter me dado a honra de ser sua orientada.

A todos aos meus professores por onde já estudei, principalmente o professor Dr. Mauro Junior Natalino da Costa.

À Universidade Federal de Lavras que foi essencial no meu processo de formação profissional tornando-se a minha segunda casa durante os dois anos de mestrado.

Ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

A todos os meus amigos do Mato Grosso que sabiam do meu sonho, acreditaram e me apoiaram em busca dele. Em especial a Patrícia Advíncola.

As tias da limpeza por cuidar do laboratório de Nematologia após os dias de extrações de solo.


Agradeço também aos meus amigos de Lavras Ana, Ariane, Kelly, Renata, Gabriela, Luís, Ananda, Cláudia, Kallyne e Vytória por todos os momentos de vivências, experiências e filosóficos.

E sou imensamente grata a todos os meus mentores e amigos do laboratório de Nematologia-UFLA: Tarlei Luiz, Dr. Willian Terra, Letícia Lopes, Dr. Paulo Victor, Danielle de Brum por seus conselhos, paciência, compreensão e me encorajar ao longo da minha pesquisa.

“

*Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei*

”

“We are the champions, my friends, and we’ll keep on fighting till the end” 

RESUMO

O nematoide de galhas, *Meloidogyne javanica*, é um patógeno danoso para a cultura da soja. Entender como os semioquímicos liberados pelo sistema radicular da soja afetam o juvenil do segundo estágio (J2) de *M. javanica* pode auxiliar no desenvolvimento de novas medidas de manejo para este patógeno. No presente estudo, foi desenvolvida uma técnica em ambiente aberto para o estudo da quimiotaxia de J2 em solo. Nossos resultados indicam que as raízes de soja cv. Monsoy 5917 IPRO liberam semioquímicos que são atraentes ($p < 0,05$) aos juvenis. Contudo, a maioria dos J2 permaneceu próximo ao local de infestação, aparentemente sem sofrer atuação dos semioquímicos. A seguir, por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), identificou-se os compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados pelo sistema radicular da soja. Um total de 13 compostos foram detectados nas emissões da soja, dos quais seis: acetato de etila, benzoato de etila, etanol e tetradecano, 2-pentilfurano e 3-pentanona, foram adquiridos e testados em ensaios de quimiotaxia *in vitro*. Além destes COVs testou-se também os compostos vanilina e ácido salicílico e estes não foram identificados no GC-MS da soja e foram utilizados para vias de comparação por constar na literatura como atraentes aos J2 de *Meloidogyne* sp. Os J2 não foram atraídos por nenhum dos seis COVs detectados na raiz da soja, mas foram altamente atraídos pelos compostos vanilina e ácido salicílico. Por fim, utilizando-se a técnica de quimiotaxia aqui desenvolvida testou-se os compostos vanilina e ácido salicílico em vasos contendo a mistura de areia e solo. No primeiro ensaio, na região de aplicação do composto ácido salicílico foram recuperados em média 6x mais J2. Entretanto, no segundo ensaio nenhum dos compostos atraiu os J2.

Palavras chaves: Nematoide das galhas, Atração e Repelência, Aleloquímicos

ABSTRACT

The root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, is a harmful pathogen for soybeans. Understanding how the semiochemicals released by the soybean root system affect the second juvenile (J2) of *M. javanica* can help in the development of new management measures for this pathogen. In the present study, an open environment technique was developed for the study of J2 chemotaxis in soil. Our results indicate that the roots of soybean cv. Monsoy 5917 IPRO release semiochemicals that are attractive ($p < 0.05$) to juveniles. However, most J2 remained close to the infestation site, apparently without being affected by the semiochemicals. Next, by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), the volatile organic compounds (VOCs) released by the soybean root system were identified. A total of 13 compounds were detected in soybean emissions, of which six: ethyl acetate, ethyl benzoate, ethanol, tetradecane, 2-pentylfuran and 3-pentanone, were acquired and tested *in vitro* chemotaxis assays. In addition to these VOCs, the compounds vanillin and salicylic acid were also tested and these were not identified in the GC-MS of soybeans and were used for comparison routes because they appear in the literature as attractive to the J2 of *Meloidogyne* sp. The J2s were not attracted to any of the six VOCs detected in soybean root, but were highly attracted to the compounds vanillin and salicylic acid. Finally, using the chemotaxis technique developed here, the compounds vanillin and salicylic acid were tested in pots containing a mixture of sand and soil. In the first test, in the region of application of the salicylic acid compound, an average of 6x more J2 was recovered. However, in the second assay none of the compounds attracted J2.

Keywords: Root-knot nematode, Attraction and Repulsion, Allelochemicals

FIGURAS

Figura 1 – Funil de Baermann modificado.....	24
Figura 2 – A) tela excluidora de raiz “cesta” com uma plântula de soja. B) cilindros metálicos de cinco, sete e 11cm de diâmetro.....	25
Figura 3 – A) Tubos metálicos de 11, sete e cinco cm alocados dentro do vaso de 15 cm de diâmetro e 12 cm de altura. B) Esquema do vaso com as distribuições espaciais: A1 região de atração 1; A2 região de atração 2; N região neutra; R região repelente.....	26
Figura 4 – A) Muda de soja em estádio vegetativo V3-V4. B) Vasos localizados em casa de vegetação do laboratório de Nematologia-UFLA. C) Tela excluidora de raiz com muda de soja alocada no centro do vaso. Setas pretas indicando o local de infestação dos J2 de <i>M. javanica</i> a dois cm da borda da tela excluidora de raiz.	27
Figura 5 – A) Pulverizador manual com bomba de pressão e válvula de controle de pressão automático com bico de ajuste de jato. B) Simulação da aplicação da água com o pulverizador manual.	28
Figura 6 – Tubos metálicos sendo colocados no vaso com o auxílio de um martelo para separar as diferentes regiões (A1; A2; N e R). Da esquerda para direita, sendo colocado primeiro o tubo de sete cm de diâmetro, e em seguida o de 11 cm de diâmetro.....	29
Figura 7 – A) Esquema da placa de Petri de 5,5 cm de diâmetro para o ensaio de quimiotaxia de J2 de <i>M. javanica</i> . Foram demarcadas três áreas: A - área teste; B - área neutra; C - área controle. B) gotas de aproximadamente 20 microlitros contendo J2 de <i>M. javanica</i> que foram depositados na área neutra da placa.....	31
Figura 8 – A) Setas vermelhas indicando o local de infestação dos J2 de <i>M. javanica</i> a três cm da marca do solo. B) Moléculas testes em estado sólido. C) Momento de aplicação da molécula.	32
Figura 9 – Percentual de juvenis de segundo estádio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> recuperado nas diferentes regiões nos experimentos I e II, após cinco dias de infestação do solo. Barras cinzas – refere-se ao tratamento sem plantas. Barras pretas – refere-se ao tratamento com a soja.	35
Figura 10 – Número de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> recuperados nas regiões atrativas 1 e nas regiões atrativas 2 nos experimentos I e II. *** Valor de P altamente significativo **Valor de P moderadamente significativo * Valor de P significativo pelo Teste t de Student (P<0,05). NS- não significativo pelo teste de T student (P>0,05).	36

Figura 11 – Representação Box Plot para o conjunto de dados do experimento de validação da técnica de quimiotaxia em ambiente aberto com vasos. A e B) Resultados referentes ao experimento I. C e D) Resultados referentes ao experimento II.**37**

Figura 12 – Estruturas químicas das moléculas voláteis selecionadas para o ensaio de quimiotaxia. I- acetato de etila. II- benzoato de etila. III- etanol. IV- tetradecano. V- 2-pentilfurano. VI- 3-pentanona. VII- ácido salicílico e VIII-vanilina. As moléculas ácido salicílico e vanilina não foram identificadas na raiz da soja.**38**

Figura 13 – Distribuição de J2 *Meloidogyne javanica* para as moléculas voláteis ácido salicílico e vanilina aplicados em vasos contendo mistura de solo e areia e extraídos os J2 de *M. javanica* apenas da região atrativa 1. Os dados são apresentados como médias e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$) Ns- os tratamentos não foram significativos pelo teste de Scott Knott ($P > 0,05$)....**40**

TABELAS

Tabela 1 – Média total da taxa de recuperação de juvenis de segundo estágio J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> extraídos do solo e areia sobre os estímulos com plantas e sem plantas dos experimentos I e II.....	34
Tabela 2 – Resumo da anova do primeiro ensaio sobre o efeito do estímulo da planta de soja na migração dos juvenis segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> , nas diferentes regiões dos vasos preenchidas com solo.	35
Tabela 3 – Resumo da anova do segundo ensaio sobre o efeito do estímulo da planta de soja na migração dos juvenis segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> , nas diferentes regiões dos vasos preenchidas com solo.....	35
Tabela 4 – Compostos voláteis identificados em raiz e caule de soja 'Cultivar Monsoy 5917' por SPME – GC-MS.....	37
Tabela 5 – Índice de quimiotaxia de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> em relação as moléculas testes colocados em placa de Petri. Os J2 foram expostos aos compostos por 16 horas.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	<i>Meloidogyne</i> spp	18
2.2	Movimento dos fitonematoides.....	19
2.3	Quimiotaxia.....	19
2.4	Técnicas de estudo em quimiotaxia com fitonematoides.....	21
3	METODOLOGIA	23
3.1	Planta empregada nos ensaios	23
3.2	Obtenção da população de <i>Meloidogyne javanica</i>	23
3.3	Desenvolvimento da nova técnica para estudos de atração de fitonematoides por plantas e por moléculas em vasos.....	24
3.4	Experimento 1- Ensaio de quimiotaxia de J2 de <i>M. javanica</i> com soja e a nova técnica.....	26
3.5	Caracterização dos compostos voláteis emitidos por raiz e caule de soja da cultivar Monsoy 5917.....	29
3.6	Ensaio de quimiotaxia <i>in vitro</i> de J2 de <i>M. javanica</i> aos COVs.....	30
3.7	Experimento 2- Ensaio de quimiotaxia em vasos usando J2 de <i>M. javanica</i> e moléculas voláteis	32
3.8	Análise Estatística	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Desenvolvimento da nova técnica para estudos de atração de fitonematoides por plantas e por moléculas em vasos.....	34
4.2	Experimento 1- Ensaio de quimiotaxia de J2 de <i>M. javanica</i> com soja e a nova técnica..	34
4.3	Caracterização dos compostos voláteis emitidos por raiz e caule de soja da cultivar Monsoy 5917.....	37

4.4	Ensaio de quimiotaxia <i>in vitro</i> de J2 de <i>M. javanica</i> aos COVs.....	38
4.5	Experimento 2- Ensaio de quimiotaxia em vasos usando J2 de <i>M. javanica</i> e moléculas voláteis	39
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	MATERIAL ADICIONAL	51

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é a espécie vegetal mais plantada no Brasil, com uma produção global de aproximadamente 360 milhões de toneladas ao ano (CONAB, 2021). Suas sementes são ricas em proteínas e lipídeos, fatos que garantem sua importância na indústria alimentar (GONÇALVES et al., 2014). Inúmeras pragas e doenças afetam negativamente a sua produtividade. Os fitonematoides estão entre os principais agentes bióticos que causam danos ao cultivo da soja. Em geral, a perda agrícola causada por eles nas diversas culturas gira em torno de 157 bilhões de dólares ao ano (SINGH et al., 2013), dos quais uma grande parte é atribuída aos nematoides de galhas (*Meloidogyne sp.*) (JONES, 2013).

Os nematoides de galhas são patógenos endoparasitas obrigatórios que estão amplamente disseminados, infectando diversas culturas importantes (FERRAZ; BROWN, 2016). Além de reduzir a produtividade, ao danificar o sistema radicular com as formações de galhas, prejudicando a absorção de água e nutrientes, eles também podem inibir as defesas dos hospedeiros, tornando as plantas suscetíveis ao ataque de outros fitopatógenos (GOVERSE; SMANT, 2014). Entre as espécies que mais causam danos, destacam-se aquelas encontradas em climas tropicais, como *M. incognita* e *M. javanica* (JONES et al., 2013).

O manejo dos nematoides de galhas é um desafio para a agricultura, pois uma vez estabelecido em determinada área a erradicação torna-se praticamente impossível. As medidas de controle envolvem a redução populacional dos fitonematoides de importância econômica na área de cultivo, no sentido de manter a população abaixo do limiar de danos econômicos (FERRAZ; BROWN, 2016). Atualmente, a estratégia mais comum para controlar esses patógenos têm sido por meio do uso de nematicidas sintéticos. Contudo, muitos deles são altamente tóxicos para a saúde humana, organismos não-alvo, e por isso muitos produtos tiveram seu uso descontinuados (FERRAZ et al., 2012).

Desta forma, atualmente buscam-se métodos alternativos de controle, que compartilham alta eficiência de controle com baixo distúrbio ao meio ambiente. Uma opção seria utilizar os compostos emitidos por raízes que atuam na quimiotaxia do nematoide em relação ao seu hospedeiro. Entender como os nematoides interagem com estes compostos pode ser um passo importante no desenvolvimento de nova estratégia de manejo (SIKDER; VESTERGARD 2020).

As raízes das plantas produzem uma diversidade de compostos secundários, que são liberados na rizosfera e medeiam interações com organismos habitantes do solo, inclusive com os nematoides. Cerca de 1% dos compostos exsudados são caracterizados como moléculas de

baixo peso molecular, com até 20 átomos de carbonos, com alta pressão de vapor e baixo ponto de ebulição, denominados de compostos orgânicos voláteis (COVs) (DUDAREVA et al., 2006). Estas moléculas podem provocar diferentes respostas nos fitonematoides, como interferir na eclosão de juvenis, reduzir a infectividade e reprodução, além de atuar como fontes de estímulos químicos (atrativos ou repelentes) (KIHKA et al., 2017; SILVA et al., 2019).

A resposta de organismos em relação a estímulos químicos pode ser definida como quimiotaxia. Este é o principal meio pelo qual os fitonematoides localizam as raízes da planta hospedeira no solo (REYNOLDS et al., 2011). Por meio dos órgãos sensoriais, o juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* é responsável por reconhecer e perceber uma série de estímulos químicos oriundos do hospedeiro (CROLL, 1977; JONES et al., 2013). Segundo Reynolds et al., (2011), os nematoides de galhas seguem a rota mais curta quando migram em direção a uma planta hospedeira. No entanto, para espécies não hospedeiras eles seguem caminhos mais longos. Tal fato pode indicar que metabólitos específicos da raiz atuam como atrativos influenciando os padrões de movimento dos nematoides para encontrar o hospedeiro mais adequado. Incluem-se ainda as moléculas que afugentam os fitonematoides em direção às raízes denominadas de repelentes.

Nos últimos anos, pesquisas sobre a atuação dos COVs na orientação dos fitonematoides têm sido estimuladas. Tem-se demonstrado que J2 de *Meloidogyne* spp. são atraídos por COVs liberados pelas raízes de plantas (RASMANN et al. 2012; KIHKA et al., 2017; MURUNGI et al. 2018). Por exemplo, o composto salicilato de metila, identificado a partir da raiz de pimenta (*Capsicum annum*) cuja cultivar é susceptível, mostrou-se atraente aos J2 de *M. incognita* (KIHKA et al., 2017). Do mesmo modo, o 2-isopropil-3- metoxipirazina e tridecano, emitido pela raiz de espinafre (*Spinacea oleracea*), causaram a atração de *M. incognita* (MURUNGI et al. 2018). Em outro estudo envolvendo a quimiotaxia de COVs liberados pelo sistema radicular, constatou-se que a resistência de plantas a fitonematoides pode envolver compostos voláteis repelentes. A cultivar de pimenta AVDRC PP0237 que é resistente a fitonematoides, emite o composto timol, que é repelente a J2 de *Meloidogyne incognita* deste patógeno (KIHKA et al., 2017).

Entender melhor as emissões voláteis das raízes nas diversas culturas usadas na agricultura com relação a atração e repelência a fitonematoides é o desafio que apenas começou nos últimos anos. Desta forma, no presente estudo objetivou-se: *i* - Estudar a quimiotaxia de *M. javanica* aos compostos emitidos por sistema radicular da cultura da soja (*Glycine Max*. L. marril). *ii* - Identificar através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas os compostos voláteis emitidos por raiz e caule da cultivar Monsoy 5917 IPRO. *iii* - Desenvolver

e descrever uma nova técnica para estudos de quimiotaxia de fitonematoides por plantas e moléculas em ambiente aberto. *iv* - Realizar ensaios de quimiotaxia de J2 de *M. javanica* com os COVs identificados nas emissões radiculares da soja e os COVs vanilina e ácido salicílico com a metodologia *in vitro* com ágar-água.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Meloidogyne* spp

Os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) são patógenos endoparasitas sedentários e compreendem o grupo de maior importância das plantas cultivadas (JONES et al., 2013), devido a sua ampla distribuição geográfica e vasta gama de hospedeiros (FERRAZ; BROWN, 2016). A suscetibilidade das culturas aos fitonematoídeos é um dos maiores obstáculos à produção de alimentos no Brasil e no mundo (SASSER, 1980). Em torno de 100 espécies do gênero *Meloidogyne* estão descritas na literatura, parasitando mais de 2000 culturas (MOREIRA et al., 2018). Dentre essas espécies, quatro têm se destacado como as mais problemáticas sendo elas: *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* como as principais espécies de climas tropicais e *M. hapla* a principal espécie de clima temperado (JONES et al., 2013), e são responsáveis por aproximadamente 95% dos prejuízos causados na agricultura (NOE, 2010).

Os nematoides de galhas apresentam as fases de ovo, quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e adultos, com duração média de 28 dias para completar o ciclo de vida (FERRAZ; BROWN, 2016), que é influenciado por muitos fatores, como temperatura, planta hospedeira, umidade, dentre outros. O ciclo começa com as fêmeas ovipositando os ovos em uma matriz gelatinosa (MOENS; PERRY; STARR, 2009). A matriz gelatinosa envolta nos ovos é chamada de massas de ovos, que os protegem de condições ambientais adversas e de predadores (EVANS; PERRY, 2009). As massas de ovos podem ficar retidas dentro do parênquima cortical ou na superfície externas das raízes e conterem em média 400 a 500 ovos. Na primeira fase, o ovo passa pela embriogênese resultando no desenvolvimento do primeiro estágio juvenil (J1), que passa pela primeira ecdise dentro do ovo para formar o juvenil de segundo estágio (J2). Sob condições ideais de temperatura e umidade os J2 eclodem usando seus estiletos para quebrar a casca dura do ovo e, então, tem início à fase migradora e infectiva (JONES et al., 2013).

Os J2 pré infectivos se movimentam no solo em busca de raízes de plantas hospedeiras guiadas por estímulos químicos radiculares (FERRAZ; BROWN 2016; CEPULYTÈ et al., 2018). Quando encontram as raízes, os J2s penetram preferencialmente na região da coifa ou zona de alongamento (CAMPOS et al., 2011). Com a ajuda do estilete bucal secretam enzimas degradadoras da parede celular. Os J2 penetrantes, migram intercelularmente em direção ao cilindro vascular, iniciando o parasitismo pela formação de um sítio de alimentação que resultará na formação de quatro a oito células nutritoras (células gigantes) de onde obtém o alimento (MOENS; PERRY; STARR, 2009). Durante a fase de alimentação, as células

próximas das células gigantes sofrem hiperplasia devido ao distúrbio hormonal o que origina o principal sintoma típico do nematoide do gênero *Meloidogyne* spp. as galhas. Posteriormente, os J2 perdem a mobilidade e tornam-se sedentários pelo resto do seu ciclo de vida (FERRAZ; BROWN, 2016). Os nematoides passam por mais outras três ecdises dentro do hospedeiro até atingirem a fase adulta (macho ou fêmea) As fêmeas, na maturidade tornam-se obesas, com formato de pera (MOENS; PERRY; STARR, 2009).

2.2 Movimento dos fitonematoides

Os nematoides parasitas de plantas se movimentam através da propulsão ondulatória (FERRAZ; BROWN, 2016). Devido à sincronização e alternância lateral da parte anterior do nematoide durante o movimento serpentiforme, as musculaturas dorsoventrais são estimuladas alternadamente e promovem a formação de meia onda (CROLL, 1967). As ondas corporais ocorrem quando há o relaxamento dos músculos dorsoventrais (ROBINSON; PERRY, 2006), controladas pelo sistema neuromuscular (GART; VELLA; JUNG, 2011). Movimentos ondulatórios são formas adaptativas que possibilitam os nematoides a se movimentarem pelas superfícies de folhas, água, raiz, solo e matéria orgânica (BURR; ROBINSON, 2004). Robson e Perry (2006) mencionam que os nematoides de galhas se movem mais lentamente do que a maioria dos nematoides, mas é importante salientar que o comprimento da onda no corpo de cada nematoide é específico e depende do ambiente em que ele se move. Wallace (1968) observou que os nematoides necessitam de uma fina película de água para mover-se livre e ativamente entre as partículas do solo e, à medida que se movem, aparece uma “trilha” com o mesmo comprimento do corpo chamado de pista sinusoidal.

A movimentação dos fitonematoides no solo é bastante limitada, e se fossem depender somente dos seus movimentos próprios não seriam amplamente disseminados nas áreas agrícolas. Por esta razão, os nematoides possuem outras formas de dispersões, nos quais estão envolvidos os processos naturais e antropogênicos. Fatores humanos são as principais formas dos nematoides parasitas de plantas espalharem-se passivamente em curtas ou longas distâncias. Nas atividades agrícolas, por exemplo, os veículos favorecem a dispersão para aquelas áreas que ainda não foram afetadas (FERRAZ; BROWN, 2016). No entanto, a migração ativa no solo ocorre somente quando a umidade, a textura e a temperatura do solo são favoráveis (WALLACE, 1973; CASTILLO; VOVLAS, 2007; FUJIMOTO et al., 2010).

2.3 Quimiotaxia

A quimiotaxia pode ser definida como a atração ou repelência de organismos a estímulos químicos (REYNOLDS et al., 2011). Os nematoides respondem a uma ampla gama de estímulos químicos por meio de órgãos receptores sensoriais (CROLL, 1977). Dentre os principais órgãos sensoriais dos nematoide existem seis papilas labiais externas, quatro papilas cefálicas, dois anfídios localizados na região dos lábios laterais e na região caudal é encontrado um par de fasmídeos (JONES, 2002). Os anfídios são os maiores e mais complexos órgãos sensoriais, pois estão expostos ao ambiente por um poro na cutícula, funcionando como quimiorreceptores (RASMAN et al., 2012).

As raízes das plantas emitem uma diversidade de compostos na rizosfera e esses compostos mediam interações subterrâneas com organismos benéficos e fitopatogênicos. Os exsudatos incluem secreção de íons, enzimas, mucilagens e uma ampla variedade de metabólitos primários e secundários (BERTIN et al., 2003). Esses compostos (exsudatos) podem provocar diferentes respostas nos fitonematoides como, desencadear a eclosão de juvenis e atrair ou repelir espécies de nematoides (MURINGI et al., 2018; SILVA et a., 2019). Durante a coevolução com as plantas, os fitonematoides se adaptaram para reconhecer e responder a estímulos químicos derivados do hospedeiro (CURTIS, 2008), sendo a quimiotaxia o principal meio no qual os nematoides são capazes de localizar uma possível planta hospedeira no solo (REYNOLDS et al., 2011).

Assim, os nematoides podem ser atraídos por compostos solúveis em água de longa cadeia de carbono e/ou compostos gasosos produzidos pelas raízes (BIRD, 2004). Esses compostos podem ser classificados de acordo com a distância em que atuam, sendo denominados: 1) atrativos de longas distâncias, 2) atrativos de curtas distâncias e 3) atrativos locais (PERRY, 2005). Os atrativos de longas distâncias atraem os nematoides por meio dos compostos orgânicos voláteis (COVs). Os atrativos de curtas distâncias direcionam os nematoides por meio de substâncias solúveis em água e enquanto os atrativos locais permitem que os nematoides endoparasitas como *Meloidogyne* spp. migrem e penetrem no local de infecção preferido nas raízes (CURTIS, 2008). Por exemplo, J2 de *Meloidogyne incognita* pode ser atraído por COVs a longas distâncias (ČEPULYTE et al., 2018), por meio de substâncias solúveis em água, além dos atrativos locais que o direciona para a região da coifa, local onde ocorre a penetração nas raízes (CAMPOS et al., 2011).

Os fitonematoides conseguem diferenciar as raízes de diferentes culturas por meio de bases olfativas. Muringi et al. (2018) observaram em ensaio de olfatômetro de dupla escolha, que os J2 de *M. incognita* têm uma atração maior por raízes de tomate do que as raízes de espinafre. No mesmo estudo, verificaram que a molécula, salicilato de metila, emitida nas raízes

de tomate contribui fortemente para a atração dos nematoides para as raízes (MURINGI et al., 2018). No entanto, a composição das emissões voláteis de cultivares podem ser diferentes e consequentemente influenciar na atração e repelência do nematoide. Kihika et al., (2017) observaram que α -pineno, limoneno, 2-metoxi-3- (1-metilpropil) -pirazina, salicilato de metila e tridecano emitidos por raízes de diferentes cultivares de *Capsicum annum* atraem J2 de *M. incognita*. Já o composto timol, também presente nesse volatiloma, foi capaz de induzir uma quimiotaxia negativa (repelente). Recentemente, foram relatados que as poliaminas, aminopropilamino-antraquinona, 1,3-diaminopropano putrescina e cadaverina, presentes em exsudatos de tomate e soja atraem J2 de *M. incognita* (OOTA et al., 2020). Oka (2020) avaliou, *in vitro*, a quimiotaxia de 60 compostos químicos aromáticos, dos quais 35 compostos atraíram três espécies de nematoides-de-galhas (*M. hapla*, *M. javanica* e *M. marylandi*). Curiosamente, nenhum dos compostos testados influenciaram a quimiotaxia de *M. incognita*. Reynolds et al. (2011) observaram que J2 de *Meloidogyne incognita* e *M. graminicola* tendem a seguir a rota mais direta possível para chegar ao hospedeiro preferido. Contudo, percorreram a rota mais longa em direção de hospedeiros pobres (resistente), indicando que os metabólitos específicos nas raízes talvez atuem como atrativos ou repelentes e, de certa forma, influenciam os padrões de movimento dos nematoides para encontrar seus hospedeiros adequados.

2.4 Técnicas de estudo em quimiotaxia com fitonematoides

Nos últimos anos alguns pesquisadores têm buscado entender em nível molecular como se estabelece a atração dos fitonematoides em direção as raízes, o que já se conhece desde longa data. Contudo, ainda são escassas as plantas estudadas. A partir do entendimento de como este processo de atração e repelência ocorre, tecnologias podem ser desenvolvidas e utilizadas no controle de fitonematoides, tanto repelindo nematoides pelas raízes como atraindo o fitonematoide para substância tóxica peletizada (nematicida). Para esta busca de aplicabilidade das moléculas atrativas e repelentes a fitonematoides necessita-se evoluir em técnicas que permitam ensaios mais próximos da realidade do campo. Até então os testes de atração e repelência têm sido feitos em placas de Petri preenchidas com ágar-água (SHIVAKUMARA et al., 2018; LIU et al., 2019; OOTA, et al., 2020; OKA, 2020), utilizando-se conexão entre vasos e tubos (DONG et al., 2014; WANG et al., 2019; PACHECO et al., 2022) e olfatômetros adaptados aos estudos com nematoides (REYNOLDS et al., 2011; KIHICA et al., 2017; MURING et al., 2018; KIRWA et al., 2018), porém todos em ambientes fechados. É urgente a busca de técnicas em sistemas abertos que representam o ambiente mais próximo encontrado

pelo J2 no solo para estudos de atração e repelência a fitonematoides e buscar municiar o melhoramento de plantas e o desenvolvimento de novos nematicidas com outras vertentes do conhecimento sobre fitonematoides.

3 METODOLOGIA

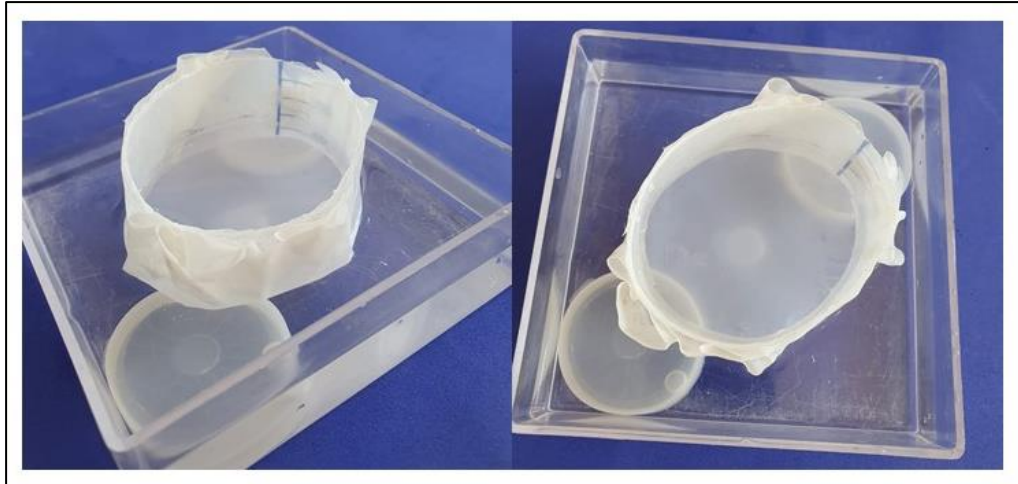
3.1 Planta empregada nos ensaios

Sementes de soja cultivar Monsoy 5917 IPRO (*Glycine max* L. Merrill) foram adquiridas localmente (Empresa – O Grupo Terras Gerais) e utilizadas nos estudos de quimiotaxia dos fitonematoides. Além disso, esta cultivar é considerada no mercado como suscetível a *Meloidogyne javanica*. Para o ensaio de desenvolvimento da nova técnica para estudos de quimiotaxia em vasos, as sementes foram semeadas em sementeiras de isopor (67 cm x 40 cm x 5 cm) contendo substrato esterilizado do tipo Plantmax. A seguir, foram colocadas em casa de vegetação do laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Na identificação dos COVs emitidos por sistema radicular da soja (Monsoy 5917 IPRO), as sementes foram superficialmente esterilizadas e semeadas em copos plásticos de 300 mL contendo areia esterilizada por autoclavagem e levadas para a câmara de crescimento a 25°C. Após a emissão de dois pares de folhas definitivas, o caule e a raiz foram seccionados para emissão dos COVs tanto da raiz e do caule.

3.2 Obtenção da população de *Meloidogyne javanica*

Juvenis de segundo estágio (J2) e ovos de *M. javanica* provenientes de populações puras foram multiplicadas em plantas de tomateiros, cultivar Santa Clara[®] e mantidas em casa de vegetação do laboratório de Nematologia – UFLA. As raízes de tomateiros infestados durante, aproximadamente, três meses foram lavadas em água parada e cortadas a 0,5 cm de comprimento. A seguir, as raízes foram trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio à 0,5% por, aproximadamente, 40 segundos, conforme técnica de Hussey e Baker (1973), modificado. A suspensão foi vertida em peneiras de 0,074 mm (200 mesh) acoplada a de 0,025 mm (500 mesh) e os ovos ficaram retidos na peneira de 500 mesh. Os ovos, assim obtidos, foram incubados em câmara de eclosão, pela técnica do funil de Baermann (1971) com modificações (Figura 1). Os J2 eclodidos nas primeiras 24h foram então descartados, e utilizados nos experimentos aqueles eclodidos entre 48 e 120h.

Figura 1 – Funil de Baermann modificado



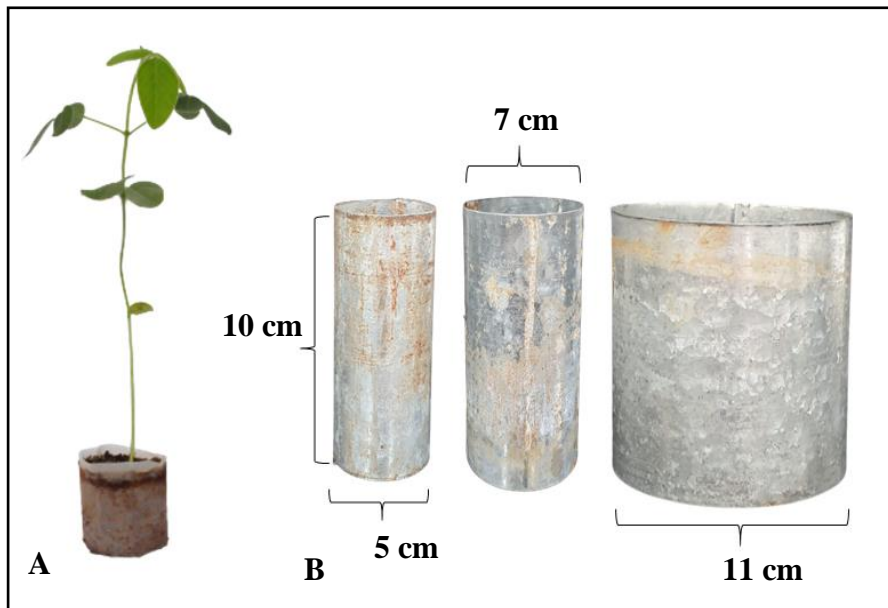
Fonte: Andrade-Souza (2022)

3.3 Desenvolvimento da nova técnica para estudos de atração de fitonematoides por plantas e por moléculas em vasos.

A motivação para desenvolver esta nova técnica se baseou no fato de que a maioria dos estudos sobre quimiotaxia de fitonematoides tem sido conduzido em ambiente fechado, por exemplo, em placas de Petri. Assim a quimiotaxia em vaso aproxima-a pesquisa à realidade do campo. Até o momento, nenhum ensaio com técnica semelhante usando vasos plásticos e telas excluidora de raízes foi descrito. Para tanto, foram desenvolvidos dois experimentos com o intuito de definir as metodologias e a validação da nova técnica. Foram estudados os exsudatos radiculares da soja na atratividade de *M. javanica* e testadas as moléculas voláteis que foram atraentes em testes *in vitro*, usando a nova técnica em vasos.

A nova técnica foi desenvolvida empregando uma tela de 0,025 mm de abertura que impedia o prolongamento das raízes além da região central de cinco centímetros (cm), mas permitia a passagem do J2 de *M. javanica*, denominada de tela excluidora de raízes (Figura 2a). A tela foi envolta no cilindro metálico de cinco cm de diâmetro para mantê-la em posição correta e as bordas foram costuradas formando uma “cesta” (Figura 2a). Assim o espaço além dos cinco cm centrais rizosférico não continham raízes.

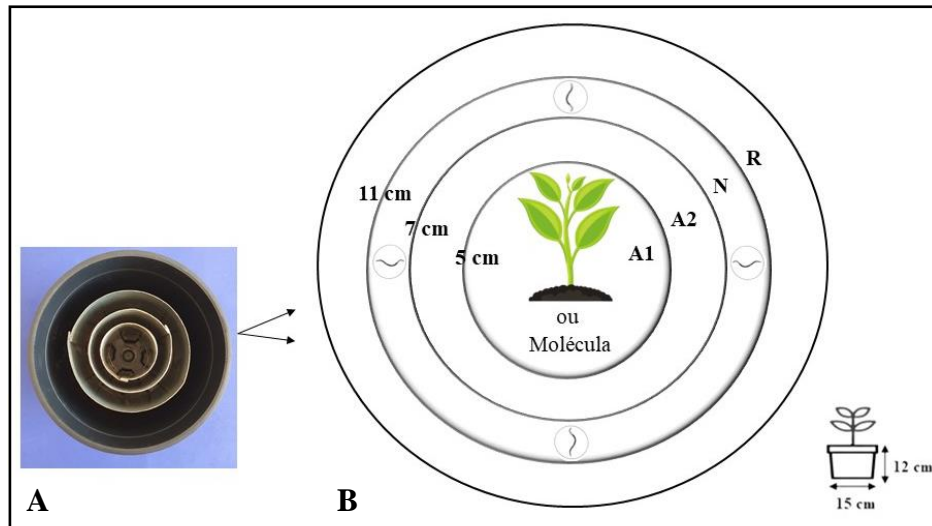
Figura 2 – A) tela excludora de raiz “cesta” com uma plântula de soja. B) cilindros metálicos de cinco, sete e 11 cm de diâmetro.



Fonte: Andrade-Souza (2022)

Com o auxílio de outros dois cilindros metálicos de sete e 11 cm de diâmetro, foram delimitadas as regiões no interior dos vasos plásticos, denominados: **atrativa 1**, de cinco cm de diâmetro onde se plantava a muda de soja dentro da “cesta” ou colocava a solução da molécula a testar; **atrativa 2** localizada entre o limite da região **atrativa 1** e o cilindro de sete cm; **neutra** formada pelo espaço entre os cilindros metálicos de sete e 11 cm e **repelente** delimitada entre o cilindro de 11 cm e a borda do vaso de 15 cm de diâmetro (Figuras 2b e 3ab). Na região neutra foi o local de infestação dos J2 de *M. javanica*. A infestação dos J2 ocorreu em uma distância a dois cm da borda da tela excludora de raiz e à 0,5 cm do cilindro de 11 cm de diâmetro. Os cilindros metálicos de sete e 11 cm de diâmetro possibilitaram definir esta distância.

Figura 3 – A) Tubos metálicos de 11, sete e cinco cm alocados dentro do vaso de 15 cm de diâmetro e 12 cm de altura. B) Esquema do vaso com as distribuições espaciais: A1 região de **atração 1**; A2 região de **atração 2**; N região **neutra**; R região **repelente**.



Fonte: Andrade-Souza (2022)

3.4 Experimento 1- Ensaio de quimiotaxia de J2 de *M. javanica* com soja e a nova técnica

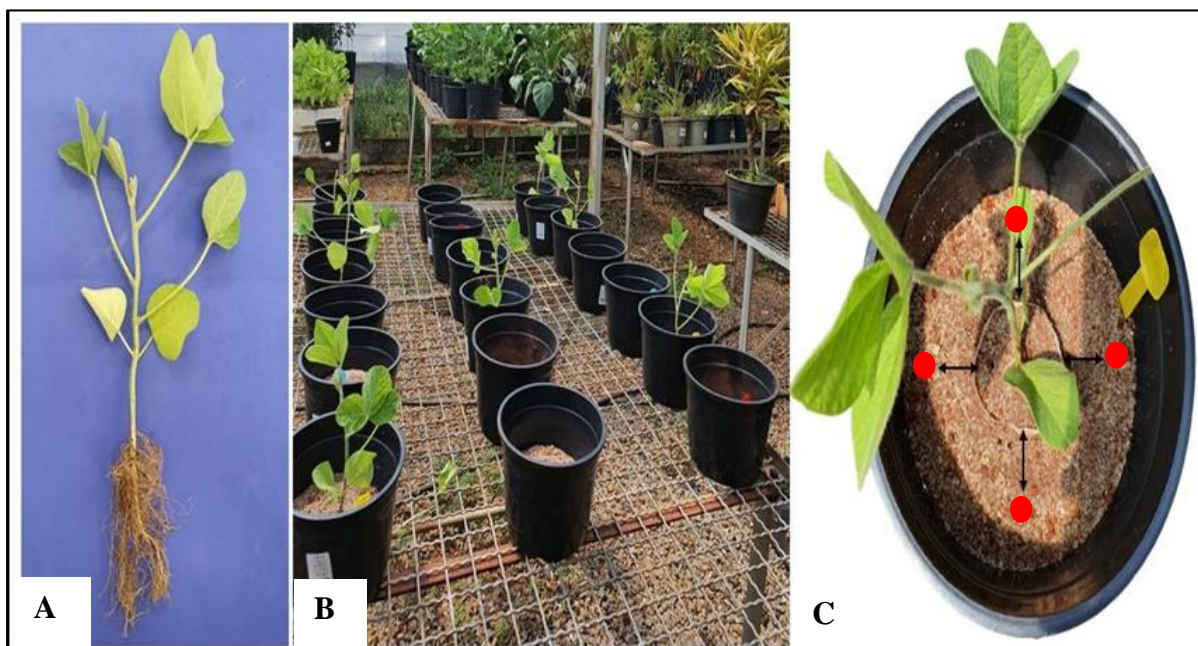
A validação inicial do ensaio de quimiotaxia com soja foi conduzida em casa de vegetação do laboratório de Nematologia do departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras – UFLA. O experimento foi conduzido com o inóculo de J2 de *M. javanica* e soja para observar o poder de atratividade da cultivar Monsoy 5917 IPRO.

A migração dos J2 foi estudada usando vasos plásticos de 15 cm de diâmetro e 12 cm de altura. Os vasos foram preenchidos com 1 kg de solo e areia (proporção 2:1, respectivamente) esterilizados por autoclavagem por 2 horas e mantido com conteúdo de água em, aproximadamente, 50% da capacidade de campo (CC). A irrigação ocorreu no final da tarde para evitar a evapotranspiração.

A muda de soja a ser transplantada na tela excludora de raiz foi lavada o sistema radicular com água deionizada para a retirada do excesso de substrato. Foram empregadas plântulas de soja em estágio vegetativo V3-V4 (Figura 4a). A tela excludora de raiz foi preenchida com, aproximadamente, 150 g de solo e areia e o restante do solo e areia foi completado ao redor da tela excludora e posteriormente, os vasos foram transferidos para a casa de vegetação (Figura 4b) com variação de temperatura. Vasos com telas excludora de raízes, mas sem plantas serviu como controle (estímulo neutro). Após três dias de transplante das mudas de soja foi feita a infestação do solo com os J2.

Os J2 eclodidos entre 48h e 120h foram coletados de funis de Baermann modificado e transferidos para câmara de Peters. O número de J2 foi determinado com o auxílio de um microscópio invertido com ampliação de 100x usando um contador de células manual, e a suspensão foi ajustada para 458 J2 por 1 mL. Aproximadamente, 4000 J2 móveis foram infestados por vaso a uma profundidade de três cm. A distribuição do inóculo ocorreu em círculo na região **neutra** (dois cm da borda da tela excluidora de raiz) colocando 1000 J2 por local de infestação em pontos cardiais equidistantes e os buracos foram fechados logo após a infestação (Figura 4c).

Figura 4 – A) Muda de soja em estágio vegetativo V3-V4. B) Vasos localizados em casa de vegetação do laboratório de Nematologia-UFLA. C) Tela excluidora de raiz com muda de soja alocada no centro do vaso. Setas pretas indicando o local de infestação dos J2 de *M. javanica* a dois cm da borda da tela excluidora de raiz.



Fonte: Andrade-Souza (2022)

A irrigação não foi realizada durante as 24h após a infestação para evitar a percolação desnecessária dos J2. Para a irrigação foi utilizado um pulverizador manual com bomba de pressão e válvula de controle automático, além de possuir bico com ajuste de jato (Figura 5a). A posição de operação foi padronizada para todos os vasos. O pulverizador foi disposto no centro do vaso e com gotas finas que simulavam “chuva” (Figura 5b), com a teoria de que a movimentação dos J2 não fossem facilitadas em direção as raízes se tivesse uma intensidade mais controlada do que se a irrigação fosse feita com o auxílio de uma pisseta. Fertilizantes não foram colocados durante a condução do experimento, a fim de observar o efeito único do

exsudato da raiz. O experimento foi em delineamento de blocos inteiramente casualizados com nove repetições por tratamento (com planta e sem planta) e repetido duas vezes no tempo.

Figura 5 – A) Pulverizador manual com bomba de pressão e válvula de controle de pressão automático com bico de ajuste de jato. B) Simulação da aplicação da água com o pulverizador manual.



Fonte: Andrade-Souza (2022)

Cinco dias após a infestação dos J2 de *M. javanica*, os vasos foram levados para o laboratório de Nematologia - UFLA e feita a avaliação das quatro regiões do solo dentro do vaso. Para isto, foram colocados os dois tubos metálicos (sete e 11cm) que serviram como suporte para a separação das regiões e também para “cortar” o solo. Depois de colocar os tubos metálicos (sete e 11 cm) a obtenção das regiões foi feita de dentro para fora (Figura 6). Assim, foi retirada a região central contida na cesta formada pela tela excluidora de raízes com a plântula de soja e toda a rizosfera denominada região **atrativa 1**. A plântula de soja foi retirada com cuidado da tela excluidora. Em um Becker foram lavadas tantas as raízes e o solo aderido na tela excluidora. O solo presente dentro da tela excluidora foi vertido para o mesmo Becker e feito a extração dos J2. O solo da região **atrativa 1** bem como o da região **atrativa 2** foram recolhidos integralmente e, separadamente, realizada a extração dos J2. As regiões **neutras** e **repelentes** também foram coletadas separadamente e transferidas para um Becker. No entanto, os solos destas duas regiões (**neutra** e **repelente**) foram pesados, homogeneizados em sacos plásticos por, aproximadamente, 40 segundos, e usados somente a metade do solo para facilitar na hora da extração e depois foram multiplicados com seus respectivos pesos o número de J2 total. Os tubos metálicos foram sempre lavados com água e sabão para a retirada do solo aderido nas paredes afim de evitar a contaminação entre as parcelas. Os J2 foram extraídos por técnica

de flutuação centrífuga (JENKINS, 1964) com modificação. Foram contados os números de J2 em microscópio de objetiva invertida, no qual toda a suspensão foi vertida numa caixa de contagem determinando o número de juvenis recuperados das regiões **atrativas 1**, **atrativas 2**, **neutra e repelente**. Ao mesmo tempo, os sistemas radiculares da soja foram corados com fucsina ácida (BYRD JR. et al., 1983).

Figura 6 – Tubos metálicos sendo colocados no vaso com o auxílio de um martelo para separar as diferentes regiões (**A1**; **A2**; **N** e **R**). Da esquerda para direita, sendo colocado primeiro o tubo de sete cm de diâmetro, e em seguida o de 11 cm de diâmetro.



Fonte: Andrade-Souza (2022)

3.5 Caracterização dos compostos voláteis emitidos por raiz e caule de soja da cultivar **Monsoy 5917**

Raízes e caules de plântulas de soja com dois pares de folhas verdadeiras foram separados. O sistema radicular e o caule foram lavados com água deionizada autoclavada a 121°C por 20 minutos. A seguir, raízes e caules, separadamente, foram cortados em segmentos de aproximadamente de 1 cm e transferidos para tubos de SPME. Os tubos foram então fechados hermeticamente e em seguida levados imediatamente à Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ/UFLA) para a caracterização dos compostos orgânicos voláteis presentes nas amostras.

Os vapores formados foram colhidos e injetados em cromatógrafo a gás para análise das moléculas. Os parâmetros empregados para a microextração em fase sólida (SPME) no modo headspace (ARTHUR, PAWLISZYN, 1990) foram os seguintes: fibra DVB/CAR/PDMS

(Divinilbenzono, Carboxen, Polidimetilsiloxano); temperatura de extração a 55°C, agitação da amostra a 250 RPM, tempo de extração de 35 minutos e tempo de dessorção no injetor do GC de 2 minutos. Para a separação e identificação dos COVs foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan) e coluna HP-5 (5% ferril-95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 x 0,25 mm x 0,25 µm. A temperatura do injetor foi de 250°C, da interface de 240°C e a da fonte de íons do detector de 200°C. O injetor foi operado no modo *splitless*. Como gás de arraste foi utilizado He grau 5.0 a 1,0 mL min⁻¹. A programação da temperatura do forno do GC foi de 40°C até 160°C a 3°C min⁻¹ e até 240°C a 10°C min⁻¹. O MS foi operado no modo de varredura na faixa de 40-350 u.m.a. Para identificação dos COVs nas amostras, os espectros de massas de cada pico do cromatograma foram extraídos através do programa Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.63. A identificação dos COVs foi realizada por comparação dos espectros de massas dos picos das amostras com espectros da biblioteca NIST pelo programa Mass Spectral Search Program v. 1.7 (NIST, Washington DC, USA) e por comparação entre os índices de retenção obtidos experimentalmente (RI Exp.) com os índices de retenção da literatura (RI Lit.) (NIST, 2013; ASMUS, 2007). Para a comparação entre os espectros de massa foram considerados somente os picos em que a similaridade entre os espectros fossem maiores que 80%. Os índices de retenção experimentais foram obtidos através da injeção de uma série homóloga de alcanos.

3.6 Ensaio de quimiotaxia *in vitro* de J2 de *M. javanica* aos COVs

Ápos a identificação dos compostos voláteis presentes no sistema radicular e caule por GC-MS, foi feita uma vasta revisão de literatura das moléculas que por ventura pudessem estar descritas ou não na literatura. Posteriormente, foram selecionadas algumas delas e adquiridas no mercado pela empresa Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Para este ensaio foram adquiridos os compostos: acetato de etila, benzoato de etila, etanol e tetradecano, 2-pentilfurano e 3-pentanona, que estavam presentes no volátiloma da soja. Adicionalmente e como comparativos, foram empregados os compostos e ácido salicílico que são descritos na literatura como atraentes. A pureza de todos os produtos químicos era de 97% ou mais.

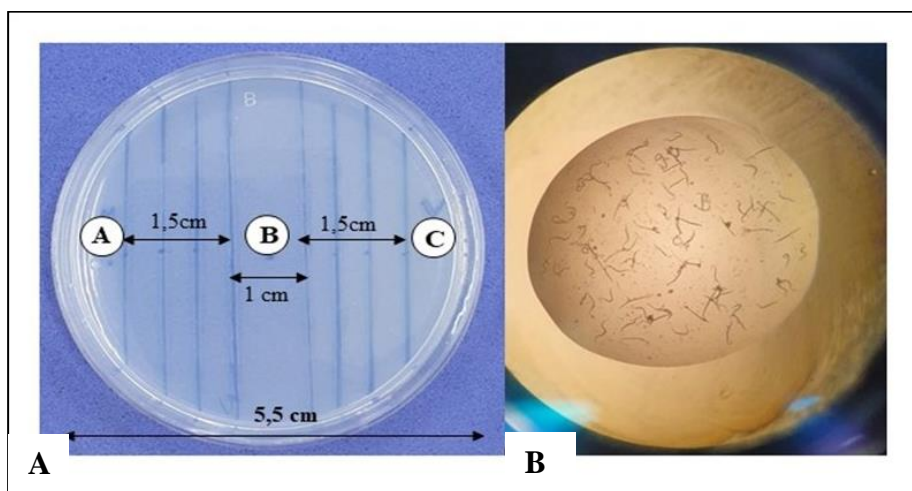
Os ensaios de quimiotaxia foram realizados de acordo com o método descrito por Bargmann, Hartweg e Horvitz (1993), com modificações. Em Placa de Petri de 55x15mm de óxido de etileno e alta transparência esterilizadas foram preenchidos com oito mL de meio de

ágar-água a 2% (massa/volume). As superfícies superiores das placas foram divididas em três partes. A) área teste; B) neutra e C) área controle (Figura 7a). Para o experimento, uma suspensão de 15 µL – 20 µL contendo 100-180 J2 foram colocados na posição B das placas (Figura 7b).

Para testar o efeito dos COVs, 1 µL da molécula líquida não diluída ou 0,5 mg de composto sólido dissolvido em 2 µL de metanol, foram pipetados na superfície do meio ágar-água na posição A. O tratamento mistura dos compostos voláteis da soja foram preparados sem diluição e usando uma concentração estoque contendo 80 µL de cada molécula da soja e aplicado deste estoque 1 µL no ágar-água. Na posição C, foi colocado nada ou o diluente metanol. As placas de controle receberam apenas fitonematoides ou fitonematoides e metanol. As placas de Petri foram fechadas e mantidas sobre uma bancada do laboratório em temperatura ambiente em torno de 25°C. As quantidades dos voláteis aplicadas no ágar-água foram baseadas no artigo do Oka (2020). O ensaio foi repetidos duas vezes no tempo e o número de repetições variou em cada tratamento devido a perda da parcela experimental.

O número de J2 nas áreas A e C foram contados 16 horas mais tarde com o auxílio de um microscopio de objetiva invertida. Com o número de J2 obtido calculou-se o índice de quimiotaxia (IQ) conforme Bargmann, Hartweg e Horvitz (1993).
$$IQ = (\text{número de J2 na área teste} - \text{número de J2 na área controle}) / (\text{N}^\circ \text{ total de J2 em área teste} + \text{número de J2 na área controle})$$
 Um $IQ > 0,2$ foi considerado altamente atraente. Um $IQ > 0,1$, mas $< 0,2$ como pouco atraente. Um $IQ > -0,1$ mas $< 0,1$ como nenhuma resposta. Um $IQ > -0,2$, mas $< -0,1$ ligeiramente repelente. Um $IQ < -0,2$ como altamente repelente.

Figura 7 – A) Esquema da placa de Petri de 5,5 cm de diâmetro para o ensaio de quimiotaxia de J2 de *M. javanica*. Foram demarcadas três áreas: A - área teste; B - área neutra; C - área controle. B) gotas de aproximadamente 20 microlitros contendo J2 de *M. javanica* que foram depositados na área neutra da placa.



Fonte: Andrade-Souza (2022)

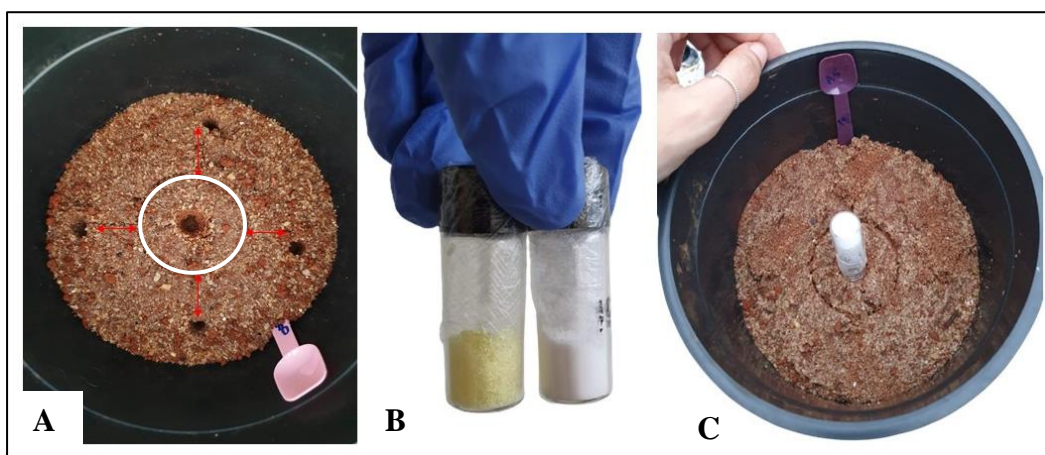
3.7 Experimento 2- Ensaio de quimiotaxia em vasos usando J2 de *M. javanica* e moléculas voláteis

Foram estudados em vasos os compostos voláteis que se mostraram atrativas nos testes *in vitro*. O experimento foi montado conforme descrito em 3.4, porém sem o uso da tela excluidora de raiz, uma vez que não se usou plantas. Os J2 de *M. javanica* foram coletados 48h – 120h e a suspensão foi calibrada para, aproximadamente, 456 J2 por 1 mL, infestando, aproximadamente, 4000 J2 móveis por vasos.

Com o auxílio de um cilindro metálico de cinco cm de diâmetro, foi feito um risco no solo para marcar o centro onde a molécula seria aplicada. A partir da marca, foi definida a distância de três cm para a infestação do J2 (Figura 8a). A infestação do fitonematoide e a aplicação das moléculas ocorreram no mesmo dia. As moléculas testes foram usadas nos seus estados sólidos em 1 g sem diluição em metanol (Figura 8b). No centro da marca, foi feito uma abertura de quatro cm de profundidade onde a molécula foi depositada e, em seguida, o solo foi repostado (Figura 8c). Um tratamento sem molécula usando somente água serviu como controle. A irrigação ocorreu do mesmo modo conforme já descrito no 3.4.

Três dias após a infestação dos fitonematoides no solo, os vasos foram levados para o laboratório e feito a extração dos J2 do solo somente da região **atrativa 1**. Então, a estrutura da unidade experimental (vasos) foi desmontada utilizando o cilindro metálico de cinco cm de diâmetro para “cortar” o solo e despejado em um becker. Posteriormente, os J2 foram extraídos por técnica de flutuação centrífuga (JENKINS, 1964) com modificação. Foram contados os números de J2 em microscópio de objetiva invertida, no qual toda a suspensão foi vertida numa caixa de contagem determinando o número de juvenis recuperados somente da região **atrativa 1**.

Figura 8 – A) Setas vermelhas indicando o local de infestação dos J2 de *M. javanica* a três cm de da marca do solo. B) Moléculas testes em estado sólido. C) Momento de



Fonte: Andrade-Souza (2022)

3.8 Análise Estatística

Utilizou-se o delineamento em blocos inteiramente casualizados para o ensaio de validação da nova técnica de quimiotaxia. Os dados deste ensaio foram previamente submetidos à transformação ($\log x$) para atender os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (Barlett). Então eles foram submetidos a análise de variância ANOVA em esquema fatorial 2 (planta e sem planta) x 4 (regiões **atrativas 1**; **atrativas 2**, **neutras** e **repelentes**). O Teste de t de Student foi utilizado para determinar se havia diferenças entre os números de J2 em áreas similares entre os vasos com e sem planta. Os experimentos, *in vitro*, de quimiotaxia foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. As repetições do experimento (experimentos 1 e 2) foram submetidas à ANOVA e não houve diferença entre elas ($P > 0,05$), então calculou-se o índice de quimiotaxia IQ ($= \text{número de J2 na área teste} - \text{o número de J2 na área controle} / (\text{N}^\circ \text{ total de J2 em área teste} + \text{número de J2 na área controle})$). No ensaio de quimiotaxia com as moléculas voláteis atraentes testadas em vasos, os dados também foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias referentes aos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R Programming R 3.5.1 (RStudio, Boston, MA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento da nova técnica para estudos de atração de fitonematoides por plantas e por moléculas em vasos.

A nova técnica possibilitou separar com precisão as diversas regiões do solo e areia **atrativa 1**, **atrativa 2**, **neutra** e **repelente**. O uso da tela excluidora de raiz na região **atrativa 1** permitiu avaliar a migração dos J2 de *M. javanica* para além destas regiões **ativas** em um espaço sem raízes (regiões **ativas 2**, **neutra** e **repelente**).

4.2 Experimento 1- Ensaio de quimiotaxia de J2 de *M. javanica* com soja e a nova técnica.

Após o término de cada extração de nematoides do solo, nenhum J2 foi encontrado na tela utilizada para delimitar a região **atrativa 1**. A porcentagem de recuperação de J2 de *M. javanica* após o processo de extração variou de 7,5 a 10%. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre o número de J2 recuperado nos vasos com plantas e sem plantas (Tabela 1). Poucos J2 penetraram no sistema radicular da soja, correspondendo a uma média inferior a 0,2% (<10) do número total de J2 colocados no solo (4000).

Tabela 1 – Média total da taxa de recuperação de juvenis de segundo estágio J2 de *Meloidogyne javanica* extraídos do solo e areia sobre os estímulos com plantas e sem plantas dos experimentos I e II

	Experimento I		Experimento II	
	J2 recuperados ^a	J2 dentro da raiz ^b	J2 recuperados ^a	J2 dentro da raiz ^b
Soja	325,2 ^{NS}	<10	299,4 ^{NS}	<10
Controle	400,98 ^{NS}	0	352,6 ^{NS}	0

a - Número médio de J2 recuperados por vaso. b - Número médio de J2 observados no interior do sistema radicular de soja. ^{NS} Indica que não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre médias da mesma coluna de acordo com o Teste t de Student. Dados originais foram transformados para Logx para satisfazer os pressupostos de homogeneidade de variâncias e normalidade. Fonte: Andrade-Souza (2022).

Nos dois ensaios realizados em vasos, a distribuição dos J2 ao longo das diferentes regiões foi influenciada pela presença da planta de soja ($P < 0,01$) (Tabela 2 e 3).

Tabela 2 – Resumo da anova do primeiro ensaio sobre o efeito do estímulo da planta de soja na migração dos juvenis segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, nas diferentes regiões dos vasos preenchidas com solo.

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
Estímulo (planta)	1	0.725	0.725	9.565	>0.065
Regiões	3	11.540	3.847	50.740	<0.001
Estímulo*Região	3	1.978	0.659	8.695	<0.001
Resíduo	55	4.170	0.076		

Fonte: Andrade-Souza (2022)

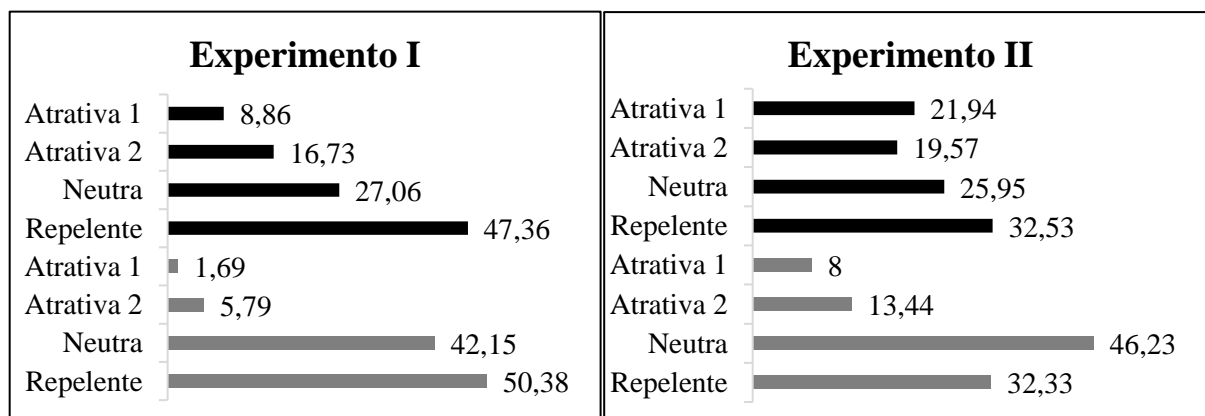
Tabela 3 – Resumo da anova do segundo ensaio sobre o efeito do estímulo da planta de soja na migração dos juvenis segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, nas diferentes regiões dos vasos preenchidas com solo.

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
Estímulo (planta)	1	1.9547	0.6516	22.197	<0.001
Regiões	3	0.0006	0.0006	0.019	>0.891
Estímulo*Região	3	1.1324	0.3775	12.859	<0.001
Resíduo	51	1.4971	0.0294		

GL- grau de liberdade. SQ – soma dos quadrados. QM – quadrado médio. Fonte: Andrade-Souza (2002).

Nos dois ensaios de quimiotaxia em vasos, houve diferença na migração de J2 ao longo das diferentes regiões (Tabela 2 e 3). Em ambos os experimentos, tanto nos vasos com plantas como naqueles sem plantas, o maior percentual de J2 concentrou-se no ponto de infestação (região **neutra**) e na região **repelente**, sendo que estes valores variaram de 25,95% a 46,23% para as regiões **neutras** e 32,33% a 50,38% para as regiões **repelentes** (Figura 9).

Figura 9 – Percentual de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* recuperado nas diferentes regiões nos experimentos I e II, após cinco dias de infestação do solo. Barras cinzas – refere-se ao tratamento sem plantas. Barras pretas – refere-se ao tratamento com a soja.

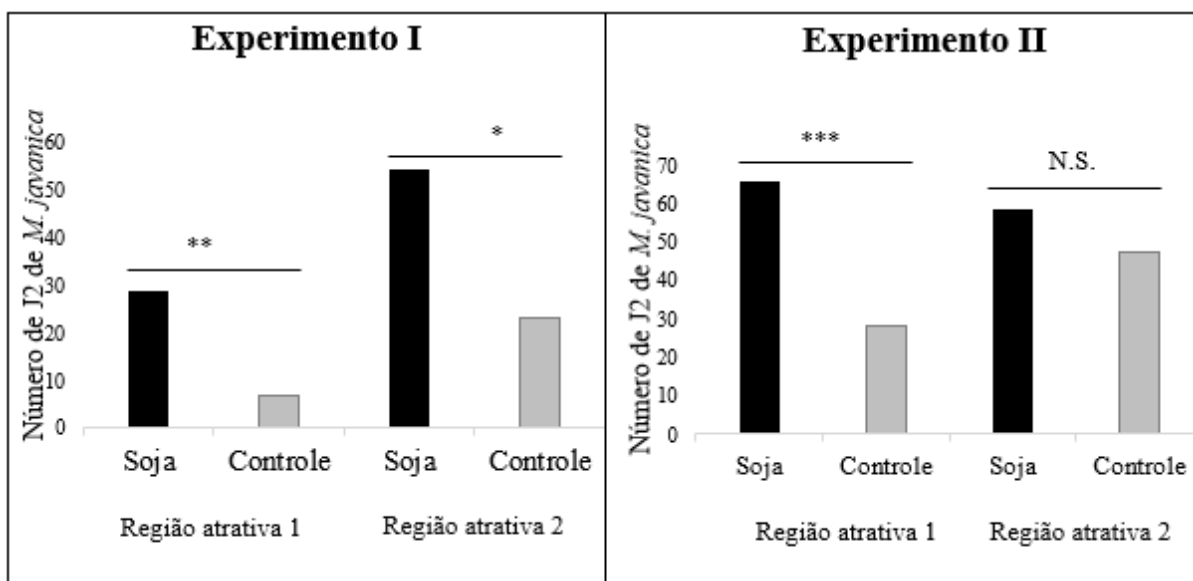


Fonte: Andrade-Souza (2022)

No experimento I, o Teste de t Student para as duas amostras independentes mostrou que há efeito da presença das raízes de soja sobre o número de J2 na região **atrativa 1** ($t(8,64) = -4,27; p < 0,001$) e na região **atrativa 2** ($t(14) = -2,92; p < 0,05$) (Figura 11). Na região **atrativa 1**, os vasos com plantas de soja continham em média quatro vezes mais J2 que aqueles sem plantas.

No segundo experimento, observou-se a mesma tendência nos dados em relação a região **atrativa 1**, onde foram recuperados mais ($t(10) = -4,73; p < 0,0001$) J2 em comparação aos vasos sem plantas (Figura 10). Na região **atrativa 1**, vasos com o estímulo da soja apresentaram em média mais que o dobro de J2 que os vasos sem soja. Neste experimento, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as regiões **atrativas 2** dos vasos com soja e aqueles sem plantas (Figura 10).

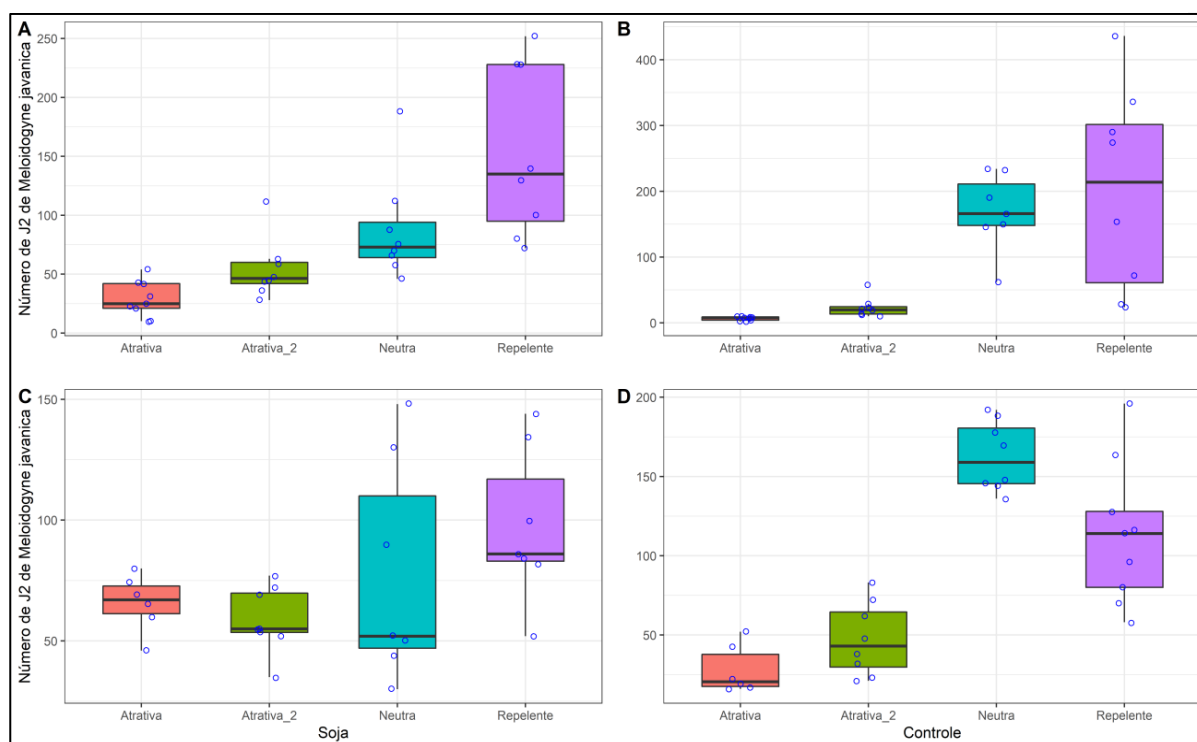
Figura 10 – Número de J2 de *Meloidogyne javanica* recuperados nas regiões atrativas 1 e nas regiões atrativas 2 nos experimentos I e II. *** Valor de P altamente significativo **Valor de P moderadamente significativo * Valor de P significativo pelo Teste t de Student ($P < 0,05$). NS- não significativo pelo teste de T student ($P > 0,05$).



Fonte: Andrade-Souza (2022)

A análise descritiva dos dados demonstra a ocorrência de uma grande dispersão dos dados na região **repelente** de todos os tratamentos. Este padrão também foi observado na região **neutra** dos vasos com planta (Figura 11).

Figura 11 – Representação Box Plot para o conjunto de dados do experimento de validação da técnica de quimiotaxia em ambiente aberto com vasos. A e B) Resultados referentes ao experimento I. C e D) Resultados referentes ao experimento II.



Fonte: Andrade-Souza (2022)

4.3 Caracterização dos compostos voláteis emitidos por raiz e caule de soja da cultivar Monsoy 5917

A análise química usando SPME - GC/MS detectou 13 compostos voláteis da raiz/caule da cultivar Monsoy 5917 IPRO (Tabela 4) Os 13 compostos voláteis foram detectados no sistema radicular, mas apenas o etanol e 1,1-dietoxy-etano estavam presentes no caule. Todos os compostos voláteis foram identificados com baixa intensidade (“v”) (Tabela 4). A massa da amostra foi pequena e por isso os picos detectados foram poucos intensos.

Tabela 4 – Compostos voláteis identificados em raiz e caule de soja 'Cultivar Monsoy 5917' por SPME – GC-MS.

Pico	RT* (min)	Nome do composto	IR exp. ^a	IR lit. ^b	Classe composto	Fórmula do composto	Monsoy 5917 IPRO	
							Raiz	Caule
1	2,10	Acetaldeído	x	x	Aldeído	CH ₃ CHO	v	
2	2,20	Etanol	x	x	Álcool	C ₂ H ₅ OH	v	v
3	2,84	Acetato de etila	608	606	Éster	C ₄ H ₈ O ₂	v	
4	3,59	1-penten-3-ol	679	688	Álcool	C ₅ H ₁₀ O	v	

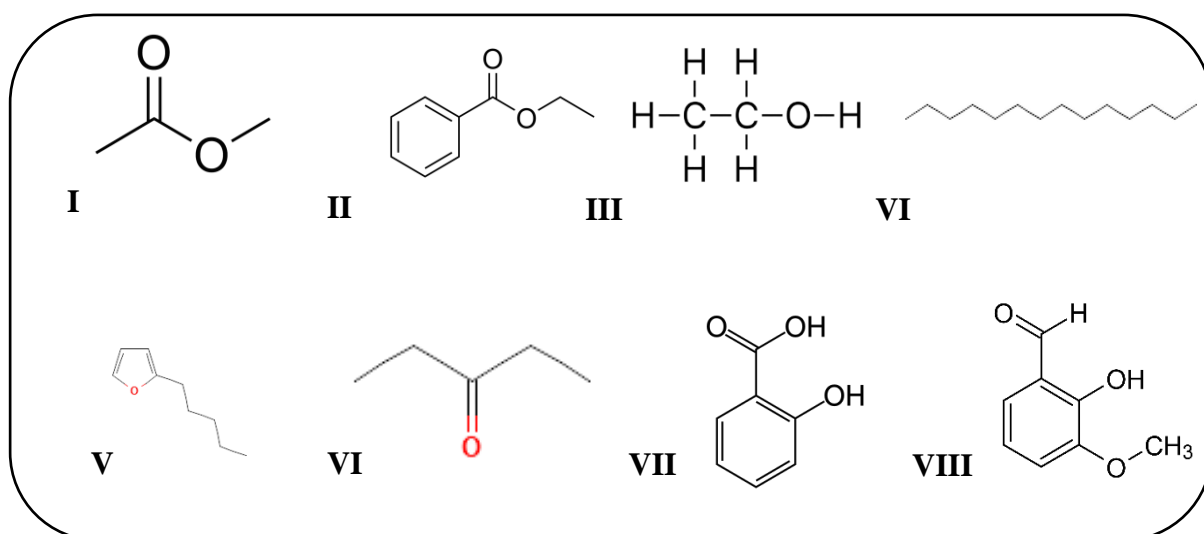
5	3,59	3-pentanona	695	700	Cetona	C ₅ H ₁₀ O	v	
6	4,32	1,1-dietoxy-etano	724	730	Éter	C ₆ H ₁₄ O ₂	v	v
7	5,94	Hexanal	800	800	Aldeído	C ₆ H ₁₂ O	v	
8	13,13	2-pentilfurano	985	991	Furano	C ₉ H ₁₄ O	v	
9	16,40	7-Methyl-1,6dioxaspiro[4.5]decane	1055	?	Éter	C ₉ H ₁₆ O ₂	v	
10	21,90	Benzoato de etila	1169	1170	Éster	C ₉ H ₁₀ O ₂	v	
11	31,80	1-tetradeceno	1375	1381	Alceno	C ₁₄ H ₂₈	v	
12	32,04	Tetradecano	1400	1400	Alcano	C ₁₄ H ₃₀	v	
13	37,95	Pentadecanal	1722	1712	Aldeído	C ₁₅ H ₃₀ O	v	

* Tempo de retenção/minuto; a - Índice de retenção experimental; b - Índice de retenção teórico. Fonte: Andrade-Souza (2022).

4.4 Ensaio de quimiotaxia *in vitro* de J2 de *M. javanica* aos COVs

Após a revisão de literatura das 13 moléculas encontradas na análise cromatográfica dos COVs emitidos pela soja, seis foram selecionadas para o teste de quimiotaxia dos J2 de *M. javanica* em placas de Petri (Figura 12). As demais moléculas não foram adquiridas devido ao alto custo e disponibilidade do produto.

Figura 12 – Estruturas químicas das moléculas voláteis selecionadas para o ensaio de quimiotaxia. I- acetato de etila. II- benzoato de etila. III- etanol. IV- tetradecano. V- 2-pentilfurano. VI- 3-pentanona. VII- ácido salicílico e VIII-vanilina. As moléculas ácido salicílico e vanilina não foram identificadas na raiz da soja.



Fonte: Andrade-Souza (2022)

Nenhum dos seis compostos emitidos por raízes de soja foi altamente atraente ao J2 *M. javanica*. Como comparativo com as demais moléculas voláteis encontradas no volatiloma da soja, o ácido salicílico e vanilina (IQ = 0,263 e 0,568, respectivamente) na dose de 0,5 mg, mostraram-se altamente atraentes, com IQ foi maior que $\geq 0,2$ (Tabela 5). No entanto, os compostos benzoato de etila, acetato de etila e tetradecano foram altamente repelentes IQ $\leq -0,2$ (IQ = -0,239, -0,255 e -0,211, respectivamente). Etanol foi apenas pouco repelente (IQ = -0,169). Duas moléculas voláteis não tiveram respostas para atrair ou repelir nematoide, sendo elas 3-pentanona e pentilfurano (IQ = -0,0088 e 0,019, respectivamente) juntamente com os tratamentos controle e metanol. A mistura de todas as moléculas voláteis de soja mostrou-se apenas pouco atraente (IQ = 0,111).

Tabela 5 – Índice de quimiotaxia de J2 de *Meloidogyne javanica* em relação as moléculas testes colocados em placa de Petri. Os J2 foram expostos aos compostos por 16 horas.

Compostos	N ^a	Dose	IQ ^z	SE ^v
Vanilina	18	0,5 mg	0,568	0,04
Ácido salicílico	17	0,5 mg	0,263	0,04
Metanol	14	1 μ L	0,019	0,04
3- Pentanona	7	1 μ L	-0,088	0,11
2 -Pentilfurano	17	1 μ L	0,019	0,07
Etanol	15	1 μ L	-0,169	0,03
Benzoato de etila	17	1 μ L	-0,239	0,07
Acetato de etila	17	1 μ L	-0,255	0,04
Tetradecano	17	1 μ L	-0,211	0,04
Mistura	15	1 μ L	0,111	0,04
Controle	17	0	-0,021	0,04

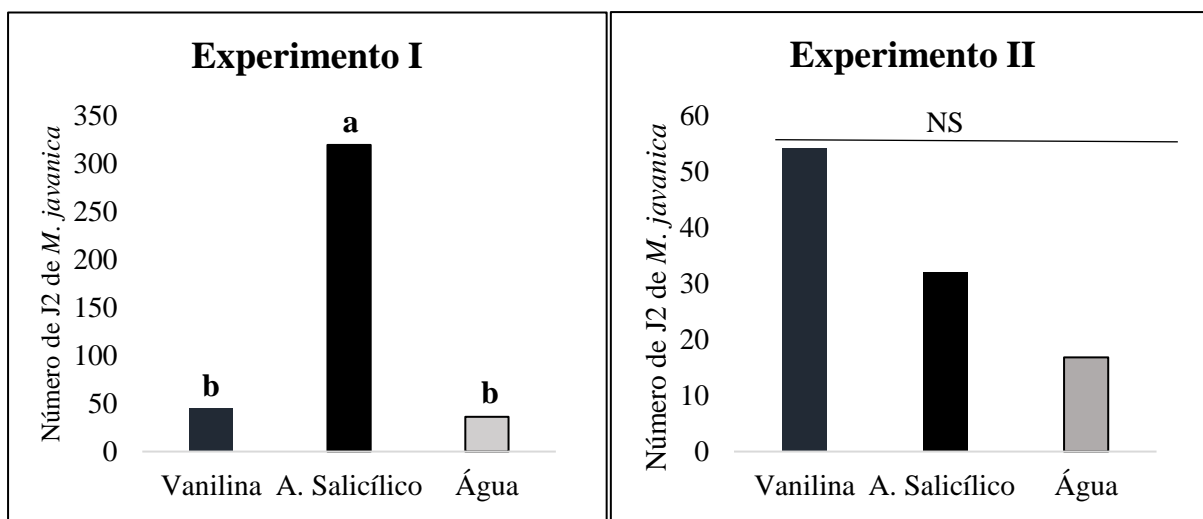
a - Número de repetições. z - Índice de quimiotaxia = (N° de J2 área a – N° de J2 na área c) / (N° J2 área a + N° de J2 área c). v - Erro padrão. Fonte: Andrade-Souza (2022).

4.5 Experimento 2- Ensaio de quimiotaxia em vasos usando J2 de *M. javanica* e moléculas voláteis

No experimento I (Figura 13), a aplicação do composto ácido salicílico na região **atrativa 1**, foi significativamente maior do que aqueles encontrados onde foi depositado a

molécula vanilina ou água (controle). No entanto, no experimento II esses três valores não diferiram entre si.

Figura 13 – Distribuição de J2 *Meloidogyne javanica* para as moléculas voláteis ácido salicílico e vanilina aplicados em vasos contendo mistura de solo e areia e extraídos os J2 de *M. javanica* apenas da região **atrativa 1**. Os dados são apresentados como médias e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$) Ns- os tratamentos não foram significativos pelo teste de Scott



Fonte: Andrade-Souza (2022)

5 DISCUSSÃO

A quimiotaxia é um comportamento importante para os fitonematoides, pois eles são obrigados a infectar um hospedeiro apropriado para completar seus ciclos de vida (TSAI et al., 2021). Uma série de técnicas tem sido relatada para estudar a quimiotaxia de fitonematoides (SPENCE et al., 2008). Destas técnicas, as que fazem uso de placas de Petri preenchidas com ágar-água são comumente as mais relatadas (MURING et al., 2018; LIU et al., 2019; OOTA, et al., 2020; OKA, 2020; PACHECO et al., 2022). A praticidade e simplicidade tornam os ensaios em placas de Petri vantajosos. Outros estudos de quimiotaxia incluem o uso de olfátômetros (KIRWA et al., 2018) vasos e copos conectados por tubos (WANG, et al., 2019; PACHECO et al., 2022), colunas verticais (OLIVEIRA et al., 2020; LEITÃO et al., 2021) e tubos falcons (CHENG et al., 2021). Entretanto, essas técnicas apresentam limitações, como: *i*) alto custo, o olfátometro, por exemplo, pode custar até US\$ 1700 dólares; *ii*) nas placas de Petri os nematoides se movem em um sistema bidimensional (JONES, 2013); *iii*) uso de tubos com diâmetros internos pequenos, em alguns casos inferiores a 1 cm (PROT, 1976). Em função das lacunas que precisam ser preenchidas em ensaios de quimiotaxia, nós propomos uma nova metodologia de baixo custo de implementação, utilizando vasos plásticos que representa o ambiente próximo ao encontrado pelos fitonematoides no solo. Também exploramos outras perspectivas usando pela primeira vez a tela excluidora de raiz, que impede que o crescimento das raízes encurte a distância em relação ao inóculo presente no solo. Assim criamos um sistema que direciona os J2 em direção a uma fonte de estímulo central em função dos compostos liberados do sistema radicular. A nova técnica também possibilitou a separação do solo no vaso em regiões **atractiva 1**, **atractiva 2**, **neutra** e **repelente** permitindo a extração dos J2 dessas regiões separadamente e os estudos de migração desses patógenos

A presença da soja na região **Atrativa 1** teve um efeito positivo sobre o número de J2 recuperados nesta região e na região **Atrativa 2**, indicando que eles migraram do ponto de infestação, direcionados pela presença de um gradiente de semioquímicos atraentes liberados pelas raízes da soja. ($P < 0,05$).

Por outro lado, os resultados do presente estudo indicam que a presença do sistema radicular da soja no solo não resultou na formação de um forte gradiente de atração dos J2 em direção as regiões **atractivas**, pois independente da presença da soja, a maior quantidade de J2 sempre foi recuperada nas regiões **neutra** e **repelente**. No trabalho de Liu et al. (2019) J2 de *M. incognita* exibiu uma forte quimiotaxia a compostos radiculares da soja. Wang et al. (2018) observaram que *M. incognita* foram apenas atraídos para as pontas das raízes da soja do que a

extratos e exsudatos coletados da raiz, sendo estes repelentes aos J2. As divergências entre os estudos pode estar relacionada a metodologia dos ensaios, aos métodos de extração dos compostos e da concentração liberada. As raízes das plantas exsudam uma diversidade de metabólitos primários e secundários que podem incluir atrativos e repelentes específicos do hospedeiro (PERRY, 2005; DUDAREVA et al., 2006; ČEPULYTĖ et al. 2018).

Além disso, muitos J2 podem ser impedidos de reconhecerem os semioquímicos atrativos por deficiência no sistema fisiológico ficando parados no local de infestação (região **neutra**) ou as diferenças em doses de semioquímicos causar tanto atração como repelência (KIHKA et al., 2017). Nos estudos de quimiotaxia tridimensionais, alguns fatores além da liberação dos semioquímicos da raiz são importantes como, a distância entre o ponto de infestação e a raiz do hospedeiro. Longas distâncias podem resultarem em J2 desorientados, e assim leva-os a consumirem todas as suas reservas de energias, tornando-os inativos (ROCHA et al., 2007; ROCHA et al., 2016). O diâmetro interno do aparato experimental constitui outro fator importante que influencia na direcionalidade dos estudos de migração, pois diâmetros menores que 4,4 cm podem restringir a dispersão horizontal e impor a migração vertical (SPENCE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2020; LEITÃO et al., 2021). No presente estudo, o diâmetro interno dos vasos foi de 15 cm, dessa forma incitou uma melhor motilidade horizontal dos J2.

A explicação para o fato de mais J2 ter sido recuperado próximo o ponto de infestação, nas regiões **neutras** e **repelentes**, pode estar na migração aleatória dos J2 que independe do estímulo da planta. Dados semelhantes foram observados com outras espécies de nematoide de galhas, em estudos de migração vertical, no qual a maioria dos nematoides permaneceu no local de infestação, não respondendo aos estímulos radiculares (OLIVEIRA et al., 2020; LEITÃO et al., 2021). Há relatos em que algumas espécies de nematoides das galhas como *M. chitwoodi* (PINKERTON et al., 1987), *M. arenaria* (SANTOS, 1973), *M. enterolobii* (OLIVEIRA et al., 2020), *M. floridensis* e *M. incognita* (LEITÃO et al., 2021) não responderam fortemente os semioquímicos liberados pelas raízes se mantendo próximos ao local de infestação.

A identificação de compostos voláteis em raiz e caule de soja revelou classes químicas distintas com a presença de três aldeídos, dois álcoois, um alceno, um alceno, uma cetona, dois éteres, dois ésteres e um furano. De uma visão ecológica e ampla, esses resultados exibem a diversidade na química de plantas hospedeiras interespecies (WILSCHUT et al., 2016; MURINGI et al., 2018) e intraespecies (VELLOSO et al., 2021). Entretanto, alguns dos COVs identificados no presente estudo coincidiram com aqueles encontrados por Velloso et al. (2021)

sendo o etanol, acetato de etila, 2-pentilfurano, 3-pentanona e hexanal como indutores da eclosão de *Heterodera glycines* em soja. As demais moléculas não estavam presentes. Tais diferenças na composição do volátiloma do presente trabalho contrastando com Velloso et al. (2021) talvez possam ser explicados pela diferença no processo de coleta dos voláteis no qual houve uma formação da câmara de gás que permaneceu fechado por cinco dias e na diferença das cultivares de soja usadas nos dois estudos.

Nos estudos de quimiotaxia em placas de Petri contendo ágar, os compostos voláteis testados mostraram diferentes modos de respostas quimiotáticas. Por exemplo, J2 de *M. javanica* foi altamente atraído por compostos não relacionados ao sistema radicular de soja, como a vanilina e ácido salicílico. Estes resultados estão de acordo com Oka (2020), no qual testou 60 compostos com estruturas químicas semelhantes ao carvacrol, dentre estes, os compostos vanilina e ácido salicílico foram reportados como altamente e moderadamente atraentes a J2 de *M. javanica*, respectivamente.

No presente estudo, pela primeira vez testou-se a quimiotaxia dos compostos acetato de etila, benzoato de etila, tetradecano, 2-pentilfurano e 3-pentanona identificados nas raízes da soja. Esses resultados indicam que nenhuma destas moléculas são atraentes aos J2 com a dose de 1 µL. Curiosamente, três compostos foram altamente repelentes, como benzoato de etila; acetato de etila e tetradecano. Por outro lado, 3-pentanona e 2-pentilfurano não tiveram nenhuma resposta aos J2. A dose testada pode ter sido insuficiente para afetar a percepção dos J2 em direção das moléculas aplica no ágar.

Outro aspecto envolvido na atração de soja a *M. javanica* neste estudo, é que nem todas as moléculas encontradas no volátiloma desta planta foram compradas e testadas como os compostos acetaldeído; 1-penten-3-ol; 1,1 dietoxi-etano; hexanal; 7-Metil-1,6dioxaspiro[4.5] decano; 1-tetradeceno e pentadecanal. Deste modo, outras moléculas poderiam ter resposta positiva aos J2. No entanto, com as moléculas presentes em tratamento mistura, a resposta dos J2 foi pouco atraente no índice de quimiotaxia. Talvez tenha ocorrido sinergismo entre as moléculas capaz de desencadear um pequeno estímulo aos J2. Assim sugere-se que, todas as moléculas em sinergismo e doses diferentes emitidas por esta cultivar poderiam causar efeito mais robusto na atração dos J2.

Para o teste, *in vivo*, os compostos vanilina e ácido salicílico foram selecionados e testados pela primeira vez no solo. Tais compostos apresentaram comportamentos distintos nos dois experimentos no tempo. No primeiro experimento, o composto ácido salicílico teve uma média superior de J2 recuperados do solo, com a aplicação de 1g da molécula e diferiu estaticamente dos demais tratamentos. Entretanto, no segundo experimento, as duas moléculas

não diferiram significativamente do tratamento controle. A razão para este comportamento distinto não é conhecida, sendo assim necessário mais estudos de quimiotaxia utilizando esta dose e avaliando as demais regiões **atrativas 1**, **atrativas 2**, **neutras** e **repelentes**, para observar a dispersão dos juvenis e a sua viabilidade.

6 CONCLUSÃO

- Foi desenvolvido uma nova técnica para estudos de quimiotaxia de fitonematoides por plantas e moléculas em vasos e que possibilitou representar o ambiente próximo ao encontrado pelos fitonematoides no solo.

- A tela excluidora de raízes na região atrativa 1 e os cilindros metálicos de sete e 11 cm de diâmetro possibilitaram separar em quatro regiões do solo no interior do vaso, como atrativa 2, neutra e repelente.

- Os J2 de *M. javanica* colocados longe das raízes da soja foram encontradas em maior quantidade na região atrativa 1 comparados com a densidade deles em tratamento controle.

- A distribuição dos J2 ao longo das regiões delimitadas pela nova técnica foi influenciada pela presença da soja.

- Foram encontradas 13 moléculas nas emissões de raízes da soja, cultivar Monsoy 5917 IPRO.

- Os J2 não foram atraídos por nenhum dos seis COVs detectados na raiz da soja, mas foram altamente atraídos pelos compostos vanilina e ácido salicílico.

- A nova técnica desenvolvida para os estudos com molécula *in vivo*, comprovou a atração das moléculas vanilina e ácido salicílico como já estudada por outros pesquisadores por J2 de *M. javanica* em testes *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, USA. v. 62, p.2145–2148, 1990.
- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition Allured Publishing Corporation, **Carol Stream**, 2007.
- BERTIN C., YANG X.H., WESTON L.A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant Soil**, v. 256, p. 67-83, 2003.
- BIRD, D. M. K. Signaling between nematodes and plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** v.7, p. 372–376, 2004.
- BURR, A.H.J.; ROBINSON, A.F. Locomotion behaviour. *In*: Gaugler, R. and Bilgrami, A.L. (eds) **Nematode Behaviour**. CAB International, Wallingford, UK, pp. 25–62, 2004.
- CAMPOS, H. D *et al.* Atração e penetração de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em raízes excisadas de soja. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1496–1502, 2011.
- CASTILLO, P.; VOVLAS N. *Pratylenchus* (Nematoda, Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management. **Nematology Monographs and perspectives**, v. 6, 529 p. 2007.
- ČEPULYTĖ, R. *et al.* Potent attractant for root-knot nematodes in exudates from seedling root tips of two host species. **Scientific Reports**, EUA, v.8, p.1-10, 2018.
- CROLL, N. A. Sensory mechanisms in nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 15, p. 75-89, 1977.
- CROLL, N. A. The mechanism of orientation in nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 13, ed. 1, p. 17-22, 1967.
- Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>, acesso em:10/12/2021.
- CURTIS, R. H. C. Plant-nematode interactions: Environmental signals detected by the nematode's chemosensory organs control changes in the surface cuticle and behaviour. **Parasite**, v. 15, p. 310-316, 2008.
- CHENG, W.L et al. Control of *Meloidogyne incognita* in three-dimensional model systems and pot experiments by the attract-and-kill effect of furfural acetone. **Plant Dis.**, 105, 2169–2176, 2021.
- DONG. L. *et al.* Lauric acid in crown daisy root exudate potently regulates root-knot nematode chemotaxis and disrupts Mi-flp-18 expression to block infection. **Journal of Experimental Botany**, v.65, p.131-141, 2014.

DUDAREVA N., NEGRE F., NAGEGOWDA, ORLOVA I. Plant volatile; recent advance and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia v25, p. 417-440, 2006.

EVANS, A. A. F.; PERRY, R. N. Survival mechanisms. *In*: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-knot Nematodes**. Wallingford: CAB International, p. 201-222, 2009.

FERRAZ, S. *et al.* **Manejo Sustentável de Fitonematoides**. 1.ed. Viçosa: Editora UFV, 306p, 2012.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. **Nematologia de Plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Ed. Norma, p.251, 2016.

FUJIMOTO, T *et al.* The effect of soil water flow and soil properties on the motility of second-stage juveniles of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1065–1072, 2010.

GART, S.; VELLA, D.; JUNG, S. The collective motion of nematodes in a thin liquid layer. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2444-2448, 2011.

GONÇALVES *et al.* **Chemical composition and technological properties of two soybean cultivars**. v.3, n.1, p. 33-40, 2014.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R.A. A comparison of methods for collecting inoculation of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v 57, p. 1025-1028, 1973.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**. v. 48, p. 692, 1964.

JONES. J: Nematode sense organs. *In*: LEE. D.L. (ed.). **The Biology of Nematodes**. New York: Taylor & Francis Inc, pp. 369-387, 2002.

JONES, J. T. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KIHIKA, R. *et al.* Parasitic nematode *Meloidogyne incognita* interactions with diferente *Capsicum annum* cultivars reveal the chemical constituents modulating root herbivory. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.4-13, 2017.

KIRWA, H.K. *et al.* Elicitation of differential responses in the root – knot nematode *Meloidogyne incognita* to tomato root exudate cytokinin, flavanoids, and alkaloids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v66, n. 43, p. 11291-11300, 2018.

LEITÃO *et al.*, Upward migration of second-stage juveniles of *Meloidogyne floridensis* and *M. incognita* under different plant stimuli. **European Journal of Plant Pathology**, v. 161, p 301-311, 2021.

LIU, W *et al.* Validation of the chemotaxis of plant parasitic nematodes toward host root exudates. **Journal of Nematology**, v. 51, n. 1, p. 1–10, 2019.

MOENS, M., PERRY, R. N., STARR, J. L. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS M.; STARR, J. L. (eds.). **Root Knot Nematodes**, pp. 1–17, 2009.

MOREIRA, F. J. C. *et al.* Assessment of the *Tephrosia toxicaria* essential oil on hatching and mortality of eggs and second-stage juveniles (J2) root-knot nematode (*Meloidogyne enterolobii* and *M. javanica*). **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 12, p. 1829-1836, 2018.

MURINGI, L. K. *et al.* Identification of key root volatiles signaling preference of tomato over spinach by the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 28, p. 7328-7336, 2018.

NIST. Chemistry Webook-National Institute of Standards and Technology. 2013.

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

OLIVEIRA *et al.* Migration and penetration of *Meloidogyne enterolobii* and *M. incognita* in soil columns with tomato and marigold. **European Journal of Plant Pathology**. V. 158, 2020.

OKA, Y. Screening of chemical attractants for second-stage juveniles of *Meloidogyne* species on agar plates. **Plant Pathology**, v.70, p. 912-921, 2020.

OOTA, M *et al.* Identification of naturally occurring polyamines as root-knot nematode attractants. **Molecular Plant**, v.13, p. 658 – 665, 2020.

PACHECO *et al.*, Attraction and toxicity: Ways volatile organic compounds released by *Pochonia chlamydosporia* affect *Meloidogyne incognita*. **Microbiological Research**, 255, 2022.

PERRY, R. N. An evaluation of types of attractants enabling plant-parasitic nematodes to locate plant roots. **Russian Journal of Nematology**, v. 13, p. 83-88, 2005.

PINKERTON, J *et al.* Vertical migration of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* under controlled temperature. **Journal of Nematology**, v. 19(2), p. 152–157, 1987.

PROT, J. Amplitude et cinétique des migrations du nématode *Meloidogyne javanica* sous l'influence d'un plant de tomate. Cahiers – ORSTOM. Série biologia, v. 6 (3), p.157-166, 1976.

RASMANN, S *et al.* Ecology and evolution of soil nematode chemotaxis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p. 615- 628, 2012.

REYNOLDS, A. M. *et al.* Chemotaxis can take plant-parasitic nematodes to the source of a chemo-attractant via the shortest possible routes. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 8, n. 57, p. 568-577, 2011.

ROCHA, F. S Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* spp. **Tese (Doutorado em Fitopatologia)** - Universidade Federal de Lavras: UFLA, p. 148, 2007.

ROCHA, FS *et al.* Migração e reprodução de *Meloidogyne incognita* em duas texturas de solo. *Nematologica*, 46 (2), p. 162-171, 2016.

ROBINSON; A. F.; PERRY, R. N. Behaviour and sensory perception. *In:* PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.). **Plant Nematology**. Wallingford: CAB International, p. 210-233, 2006.

SILVA, J. C. P *et al.* Performance of volatiles emitted from different plant species against juveniles and eggs of *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**. v. 116, p. 196-203. 2019.

SHIVAKUMARA, T. N.; DUTTA, T. K.; RAO, U. A novel in vitro chemotaxis bioassay to assess the response of *Meloidogyne incognita* towards various test compounds. **Journal of Nematology**, v. 50, n. 4, p. 487-494, 2018.

ROHLOFF, J.; BONES, A.M. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana*—putative olfactory compounds in plant communication. **Phytochemistry** v. 66, p. 1941-1955. 2005.

SIKDER, M.M.; VESTERGARD, M. Impacts of root metabolites on soil nematodes. **Frontiers in Plant Science**. v. 10, p. 1-18, 2020.

SPENCE, K. O., LEWIS, E. E.; PERRY, R. N. Host-finding and invasion by entomopathogenic and plant-parasitic nematodes: Evaluating the ability of laboratory bioassays to predict field results. **Journal of Nematology**, v. 40(2), p. 95-98, 2008.

SANTOS, M. S. N. A. Mobility of males of *Meloidogyne* spp. and their responses to females. *Nematologica*, v. 19, p. 521-527, 1973.

SINGH, S. K.; HODDA, M.; ASH, G. J. Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main host and reported yield losses. **OEPP/ EPPO Bulletin**, v. 43 p. 334-374, 2013.

TSAI, A.Y *et al.* Root-knot nematode chemotaxis is positively regulated by L-galactose sidechains of mucilage carbohydrate rhamnogalacturonan-I. **Science Advances**. Vol 7, n 27, 2021.

WALLACE, H.R. The dynamics of nematode movement. South Australia. **Annual Review of Phytopathology**, v. 6, p. 91-114, 1968.

WALLACE, H. R. Nematode ecology and plant disease. London: Edward Arnold, p. 228, 1973.

WANG, P. *et al.* Chemotactic responses of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to *Streptomyces plicatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.366, p.1-7, 2019.

VELLOSO *et al.* Slight induction and strong inhibition of *Heterodera glycines* hatching by short-chain molecules released by different plant species. **Journal Nematology**. p 53. 2021

WANG C, MASLER EP, ROGERS ST. Responses of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* infective juveniles to root tissues, root exudates, and root extracts from three plant species. **Plant Disease**. 102:1733–1740, 2018.

WILSCHUT, R et al., Interspecific differences in nematode control between range-expanding plant species and their congeneric natives. **Soil Biol. Biochem**, v. 100, p. 233– 241, 2016.

MATERIAL ADICIONAL

Nota da autora: Alguns entraves foram observados durante a condução do experimento com plantas. Quando as sementes de soja foram semeadas diretamente no interior da região *atrativa*, à medida que o sistema radicular secundário foi crescendo e seguindo a curvatura para baixo ou indo em direções laterais, eles foram passando por entre os pontos onde foi feita a costura. Desta forma, houve a necessidade de passar cola quente onde tinha sido feito os pontos das costuras para evitar que as raízes escapassem. No entanto, as raízes continuaram escapando por entre os poros da tela excluadora. Concluindo-se que, as pontas das raízes desta cultura soja são muito finas e penetram em poros bastante pequenos e são capazes de detectar os espaços vazios ao redor e seguir por eles. Em vista disso, recomenda-se: se o experimento for semeadura direta, realizar as avaliações até atingir dois pares de folhas ou trabalhar com plantas transplantadas; Não usar as telas excluadoras mais que três vezes; Atenção no momento da lavagem, por exemplo, não deixar de molho em hipoclorito de sódio á 9% por muito tempo ou passar escova com força bruta, pois estica e desgasta a tela.

No transplante das mudas de soja, o melhor não foi encher toda a tela excluadora de raiz primeiro para depois fazer o transplatio. As mudas então, foram alocadas no centro da tela e despejado o solo:areia, assim o sistema radicular pode ser distribuído melhor no interior da tela excluadora de raiz. Recomenda-se, abrir melhor as raízes secundárias depois que as mudas estiverem mais secas, e não deixar com a curvatura toda para baixo quando ficam excessivamente molhadas, acredita-se que deste modo as raízes não fiquem compactadas com o solo e ajudem a ficarem mais próximas das laterais da tela excluadora de raiz. Para facilitar a desmontagem da unidade experimental e separar as áreas neutra e repelente, sugere-se a confecção de “alças” metálicas nos tubos metálicos para ajudar no “corte” do solo.