

# CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS GIGANTES INDUZIDAS POR *MELOIDOGYNE EXIGUA* EM RAIZ DE SERINGUEIRA (*HEVEA BRASILIENSIS* MUELL. ARG.)

C. F. Corrêa<sup>1</sup> e R. A. Rodella<sup>1</sup>

Universidade Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil.<sup>1</sup>

---

## RESUMO

Corrêa, C. F. e R. A. Rodella. 2001. Caracterização das fases de desenvolvimento de células gigantes induzidas por *Meloidogyne exigua* em raiz de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Nematropica* 32:131-136.

Foi estudado o desenvolvimento das células gigantes em raiz de seringueira infestada por *M. exigua*, com base em contagens e mensurações do tamanho dessas células, em oito épocas de coleta. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se os métodos estatísticos de Análise de Agrupamento e Análise de Componentes Principais. Verificou-se a nítida distinção entre as épocas de coleta em relação ao desenvolvimento das células gigantes, estabelecendo-se a fase inicial, de equilíbrio, de eleição e final do ciclo de infestação do nematóide.

*Palavras-chave:* análise multivariada, histopatologia, nematóide de galhas.

---

## ABSTRACT

Corrêa, C. F., and R. A. Rodella. 2001. Characterization of developmental phases of giant cells induced by *Meloidogyne exigua* in rubber plant (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) root. *Nematropica* 32:131-136.

The developmental phases of giant cells induced by root-knot nematodes (*Meloidogyne exigua*) in rubber plant (*Hevea brasiliensis*) root were studied in relation to its number and size evaluated in eight sample dates. The results were subject to cluster analysis and principal component analysis. Sample dates were clearly distinct regarding giant cell development. As a result, the nematode infestation cycle was characterized by the following sequential phases: initial, equilibrium, choice and final.

*Key words:* histopathology, multivariate analysis, root-knot nematodes.

---

## INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) é uma Euforbiácea descoberta pelos franceses no Vale Amazônico no século XVI, que chamou a atenção pelas propriedades elásticas do seu látex (Haag, 1983). O látex, também conhecido como borracha natural, é a base de vários produtos industrializados, como pneus, mangueiras, luvas cirúrgicas, condutores elétricos, preservativos e fios elásticos (Dassie, 1995).

Atualmente, a espécie de *Meloidogyne* mais prejudicial para a seringueira no Brasil

é *M. exigua* Goeldi, principalmente no Estado do Mato Grosso. Além dos danos diretos, esse nematóide é agente predisponente para a ação do fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. et Maubl. Em conjunto, esses dois patógenos causam uma doença caracterizada pela morte descendente da seringueira (Santos, 1992). A partir dessa observação, vários trabalhos têm sido realizados no sentido de diminuir os danos causados por *M. exigua* à seringueira.

Os nematóides de galhas, como é o caso de *M. exigua*, prejudicam a formação das mudas e o desenvolvimento natural da

seringueira, pela diminuição da capacidade das raízes de absorver água e nutrientes, resultando em baixa produção de látex. Ocasionalmente, esses nematóides podem levar a planta à morte (Lordello e Veiga, 1983; Carneiro e Altéia, 1990; Santos, 1992). Não se conhecem cultivares de seringueira resistentes a esse patógeno e, no Estado de São Paulo, 90% dos seringais são constituídos pelo cultivar RRIM 600, de origem asiática, que é altamente suscetível aos nematóides de galhas (Silveira, 1992).

Fonseca e Jaehn (2000) observaram, em raízes de seringueira parasitadas por *M. javanica* (Treub.) Chitwood, diversos mecanismos de resistência, destacando-se o acúmulo de compostos fenólicos, a formação de cristais de oxalato de cálcio em células parenquimáticas próximas à endoderme e a lignificação das paredes de células do parênquima vascular e da célula gigante.

Estudos anatômicos de raízes de seringueira suscetível à *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood revelaram que os juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) penetram nas raízes pela região do meristema apical e migram até o cilindro vascular, induzindo a formação de três a oito células gigantes, que se comportam como células de transferência (Huang, 1985), possuindo a função de fornecer nutrientes essenciais para o desenvolvimento do nematóide (Jones, 1981; Huang, 1985). Assim sendo, o conhecimento das fases de desenvolvimento das células gigantes apresenta importância nos estudos histopatológicos; entretanto, não se encontram na literatura trabalhos relacionados com o ciclo de desenvolvimento destas células induzidas por *M. exigua*.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar a seqüência do desenvolvimento das células gigantes formadas nas raízes de seringueira, infestadas por *M. exigua*, em oito épocas de coleta.

## MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de seringueira foram obtidas a partir de sementes clonais do cultivar RRIM 600, provenientes da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, Estado de São Paulo e da Companhia Agrícola Cambuhy, Matão, Estado de São Paulo. As sementes foram colocadas para germinar em caixas de madeira contendo areia peneirada e esterilizada, sob condições de casa de vegetação. Aos 15 dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para vasos de argila de 2 litros de capacidade, contendo uma mistura de solo-areia-matéria orgânica (3:1:1) previamente esterilizada por calor úmido (autoclavagem a 1 atm por 2 h).

A população de *M. exigua* foi obtida a partir de raízes de seringueira coletadas na Fazenda Michelin, Rondonópolis, Estado de Mato Grosso. Essa população foi multiplicada em plantas de seringueira em casa de vegetação, utilizando-se as raízes parasitadas para o preparo do inóculo, de acordo com a técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz (1981).

As plantas de seringueira foram inoculadas com 5 ml de uma suspensão contendo 5000 juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) por ml, colocada em três orifícios com 3 cm de profundidade, distantes cerca de 1 cm do caule das plantas, que foram mantidas em casa de vegetação com temperatura média de 28°C.

Após a inoculação, a cada cinco dias foram amostradas três plantas, perfazendo oito épocas de coleta (de 25/10 a 30/11), cortando-se fragmentos de raízes de 0,5 a 1 cm de comprimento contendo galhas típicas. Os fragmentos foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratados em série alcoólica-etflica, infiltrados com a resina glicol metacrilato (Gerrits, 1991), seccionados transversalmente a 8  $\mu$ m de espessura em micrótomo

rotatório, corados com floxina B por 15 minutos e com azul de toluidina 0,05 % em tampão acetato pH 4,7 por 3 minutos (O'Brien *et al.*, 1964), sendo, em seguida, montadas as lâminas em resina sintética.

Para se proceder às avaliações anatômicas quantitativas, realizaram-se, em 30 repetições por época de coleta, as contagens e as mensurações de área das células gigantes e dos sítios de alimentação (conjunto de células gigantes) em mesa digitalizadora acoplada a programa computacional, sendo os dados submetidos aos métodos estatísticos multivariados de Análise de Agrupamento e Análise de Componentes Principais (Sneath e Sokal, 1973).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os valores médios referentes ao número e à área das células gigantes e dos sítios de alimentação, avaliados em oito épocas de coleta, empregados para a realização da análise estatística multivariada.

O resultado da Análise de Agrupamento, representado na forma de dendrograma (Fig. 1), permitiu agrupar as épocas de coleta estudadas, de forma que aquelas pertencentes a um mesmo grupo apresen-

taram maior similaridade que as coletas de grupos diferentes. As oito épocas de coleta constituíram três grupos principais, ao nível de 0,24 da escala de distância de similaridade, os quais mostraram a seguinte disposição: grupo 1—formado pela 1ª (25/10) e 8ª (30/11) épocas de coleta; grupo 2—composto pela 2ª (30/10), 3ª (05/11) e 4ª (11/11) épocas, apresentando maior similaridade as duas últimas; grupo 3—formado pelas 5ª (15/11), 6ª (20/11) e 7ª (25/11) épocas, sendo que as duas últimas apresentaram maior similaridade.

A dispersão gráfica (Fig. 2) das oito épocas de coleta revelou que, com relação ao primeiro componente principal ( $Y_1$ ), as quatro coletas iniciais (de 25/10 a 11/11) se diferenciaram das quatro finais (de 15/11 a 30/11), como se pode observar através do contraste entre as coletas iniciais (com sinal positivo para  $Y_1$ ) e as finais (com sinal negativo para  $Y_1$ ). Para o segundo componente principal ( $Y_2$ ), a 1ª (25/10) e a 8ª (30/11) épocas apresentaram sinal negativo para  $Y_2$ , diferenciando-se das demais, que apresentaram sinal positivo para este componente. Ficou também caracterizada a formação de três grupos distintos, os quais apresentaram a mesma disposição indicada pelo dendrograma.

Tabela 1. Valores médios do número de células gigantes (NCG), da área ( $\times 10^4$  mm<sup>2</sup>) da célula gigante (ACG), do número de sítios de alimentação (NSA) e da área ( $\times 10^4$  mm<sup>2</sup>) do sítio de alimentação (ASA), em raiz de seringueira infestada por *Meloidogyne exigua*, avaliados em oito épocas de coleta.

Épocas de coleta	NCG	ACG	NSA	ASA
1ª coleta (25/10)	11,0	56,0	3,3	240,0
2ª coleta (30/10)	23,0	65,0	4,7	406,0
3ª coleta (05/11)	20,0	82,0	5,3	321,0
4ª coleta (11/11)	20,0	76,0	5,0	316,0
5ª coleta (15/11)	3,0	136,0	1,0	408,0
6ª coleta (20/11)	7,5	139,0	3,0	348,0
7ª coleta (25/11)	8,5	127,0	2,5	473,0
8ª coleta (30/11)	11,3	108,0	3,3	278,0

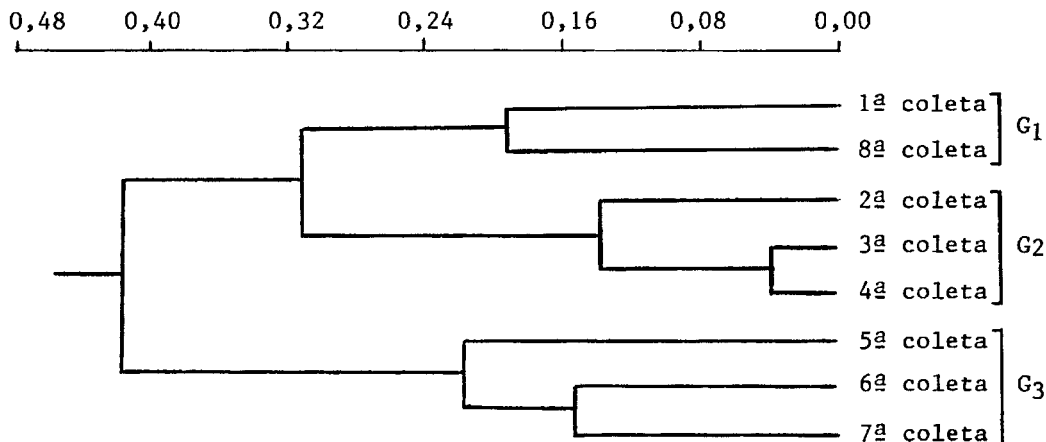


Fig. 1. Análise de Agrupamento das variáveis anatômicas quantitativas da raiz de seringueira infestada por *Meloidogyne exigua*, utilizando a Distância Euclidiana Média entre as oito épocas de coleta. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3. Numeração de 1 a 8: 1ª a 8ª épocas de coleta.

Na Tabela 2 constam os coeficientes de correlação entre quatro variáveis anatômicas quantitativas da raiz e dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ). Verifica-se que, para o primeiro componente ( $Y_1$ ), o número de células gigantes, o número dos sítios de alimentação e a área (tamanho) da célula gigante foram as variáveis que mais contribuíram para a discriminação entre as

épocas de coleta, uma vez que essas variáveis apresentaram maior valor absoluto de  $Y_1$ , revelando, portanto, alto poder discriminatório. Quanto ao segundo componente ( $Y_2$ ), a área do sítio de alimentação foi a variável que apresentou maior poder discriminatório. O primeiro componente principal ( $Y_1$ ) foi responsável por 81,30% da informação contida no conjunto das quatro variáveis analisadas, enquanto o segundo componente ( $Y_2$ ) apresentou apenas 12,62% da informação retida.

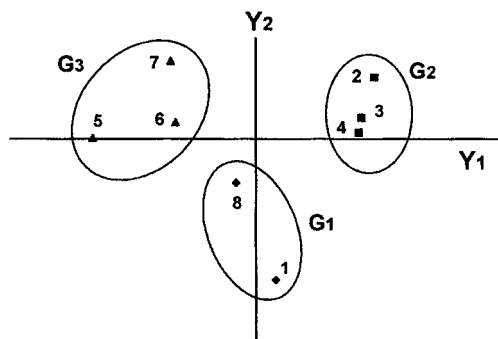


Fig. 2. Dispersão gráfica das oito épocas de coleta, utilizando os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ), para o conjunto das quatro variáveis anatômicas quantitativas da raiz de seringueira infestada por *Meloidogyne exigua*. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3. Numeração de 1 a 8: 1ª a 8ª épocas de coleta.

A análise das Tabelas 1 e 2, juntamente com a Fig. 2, permite considerar que:

a) a 1ª (25/10) e a 8ª (30/11) épocas de coleta, constituintes do grupo 1, apresentaram similaridade entre si; assim na 1ª época surgem as células gigantes, devido ao estímulo provocado pelo nematóide na raiz, que mostram tendência de aumentar em quantidade, mas permanecendo ainda com tamanho reduzido; na 8ª época ocorre diminuição no tamanho das células gigantes devido à degeneração, bem como da área dos sítios de alimentação, condicionando a semelhança com o

Tabela 2. Correlações entre quatro variáveis anatômicas quantitativas da raiz de seringueira infestada por *Meloidogyne exigua*, avaliadas em oito épocas de coleta, e os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ). Porcentagem da informação retida e acumulada em  $Y_1$  e  $Y_2$ , e ordenação (ORD) das variáveis quanto ao seu poder discriminatório.

Variáveis originais	$Y_1$ (ORD)	$Y_2$ (ORD)
Número de células gigantes	0,9746 (1)	0,2080 (3)
Área da célula gigante	-0,8596 (3)	0,3799 (2)
Número dos sítios de alimentação	0,9656 (2)	0,1001 (4)
Área do sítio de alimentação	-0,3655 (4)	0,8484 (1)
% Informação retida	81,30	12,62
% Informação acumulada	81,30	93,92

início da infestação; desta forma, as características presentes nestas duas épocas permitem o reconhecimento de duas fases do ciclo de infestação do nematóide, designadas como fase inicial e fase final;

- b) a 2ª (30/10), a 3ª (05/11) e a 4ª (11/11) épocas de coleta, formadoras do grupo 2, apresentaram aumento do número de células gigantes e dos sítios de alimentação, em relação ao grupo 1, enquanto o tamanho da célula gigante teve discreto aumento; estas alterações caracterizam a fase de equilíbrio do ciclo de infestação;
- c) a 5ª (15/11), a 6ª (20/11) e a 7ª (25/11) épocas de coleta, constituintes do grupo 3, apresentaram aumento no tamanho da célula gigante e do sítio de alimentação; nessa fase, o nematóide elege uma célula gigante e a estimula continuamente, provocando acréscimo em seu tamanho, enquanto as demais degeneram por ausência do estímulo; esse fato acarreta redução na quantidade de células gigantes e dos sítios de alimentação, caracterizando a fase de eleição do ciclo de infestação do nematóide.

Desta forma, os eventos ocorrentes no processo de desenvolvimento das células gigantes podem ser caracterizados pelas

fases inicial, de equilíbrio, de eleição e final do ciclo de infestação. Com a formação dos três agrupamentos (Figs. 1 e 2), verificou-se que o primeiro grupo foi constituído pelas fases inicial (1ª coleta) e final (8ª coleta) do ciclo, o segundo grupo pela fase de equilíbrio (2ª, 3ª e 4ª coletas) e o terceiro grupo pela fase de eleição (5ª, 6ª e 7ª coletas), refletindo com grande fidelidade as fases do desenvolvimento das células gigantes formadas nas raízes de seringueira.

Constatou-se também que os métodos estatísticos multivariados empregados neste trabalho foram satisfatórios, uma vez que houve boa concordância entre os resultados obtidos na Análise de Agrupamento (Fig. 1) e na Análise de Componentes Principais (Fig. 2), ocorrendo alto valor (93,92%) da porcentagem de informação acumulada pelos dois primeiros componentes principais (Tabela 2).

#### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Camargo Barbosa Ferraz, do Setor de Zoologia Agrícola, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, e à Profa. Dra. Sílvia Renata Siciliano Wilcken, do Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas de

Botucatu, Universidade Estadual Paulista, pela revisão crítica do manuscrito.

LITERATURA CITADA

- BONETTI, J. I. S. e S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de café. Fitopatologia Brasileira 6:553.
- CARNEIRO, R. G. e A. A. K. ALTÉIA. 1990. Constatação de *Meloidogyne incognita* em seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Paraná. Nematologia Brasileira 14:6-7.
- DASSIE, C. 1995. A realidade das seringueiras no Brasil. Silvicultura 16:27-28.
- FONSECA, H. S. e A. JAEHN. 2000. Estudos dos mecanismos de resistência em raízes de porta-enxertos de seringueira inoculadas com *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 24:233-237.
- GERRITS, P. O. 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology: some fundamental principles. State University Groningen, Netherlands. 80 pp.
- HAAG, H. P. 1983. Nutrição e adubação da seringueira no Brasil. Fundação Cargill, Campinas, SP, Brasil. 116 pp.
- HUANG, C. S. 1985. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. Pp. 155-164 in J. N. Sasser, and C. C. Carter, eds. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.
- HUSSEY, R. S., and K. R. BARKER. 1973. A comparison of nematodes of methods of collecting inocula on *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.
- JONES, M. G. K. 1981. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. Annals of Applied Biology 97:353-372.
- KARNOVSKY, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27:137-138.
- LORDELLO, L. G. E. e A. S. VEIGA. 1983. Nematóides em seringueira. Revista de Agricultura 58: 203-207.
- O'BRIEN, T. P., N. FEDER, and M. E. McCULLY. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. Protoplasma 59:368-373.
- SANTOS, J. M. 1992. *Meloidogyne exigua*, sério patógeno da seringueira nas plantações E. Michelin, em Rondonópolis, MT. Congresso Brasileiro de Nematologia, Lavras, MG, Brasil, p. 75. Resumos.
- SILVEIRA, S. G. P. 1992. Nematóides associados à cultura da seringueira (*Hevea* spp.). Pp. 78-82 in M. J. S. Medrado *et al.*, eds. Formação de mudas e plantio de seringueira. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP, Departamento de Agricultura, Piracicaba, SP, Brasil.
- SNEATH, P. H. A., and R. R. SOKAL. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco, CA, USA. 573 pp.

Received:

27.V.2002

Accepted for publication:

15.VIII.2002

Recibido:

Aceptado para publicacion: