

ARTIGOS

HISTOPATOLOGIA DE *PHASEOLUS ATROPURPUREUS* INFECTADO COM *MELOIDOGYNE JAVANICA* *

JOSÉ C. A. ARAÚJO¹ & CHAW-SHUNG HUANG²

¹CPAA-EMBRAPA, C. Postal 319, 69.001, MANAUS, AM;

²Campbell Institute for Research and Technology, Rout 1 Box 1314 - Davis, CA 95161, USA.

(Aceito para publicação em 24/04/92)

ARAÚJO, J. C. A. & HUANG, C.S. Histopatologia de *Phaseolus atropurpureus* infectado com *Meloidogyne javanica*. Fitopatol. bras. 17:237-240. 1992.

RESUMO

Penetração, distribuição e desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* nos tecidos radiculares de *Phaseolus atropurpureus* e reações histológicas do hospedeiro ao nematóide, foram estudados aos 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação. Larvas vermiformes de 2^o estágio já penetravam nas extremidades radiculares (meristema apical), um dia após a inoculação. Aos sete e quatorze dias foram observadas larvas vermiformes na extremidades radicular e no cilindro vascular da região de maturação. Aos 21 dias, a população do nematóide aumentou no cilindro central, onde se tornaram sedentários. Nematóides adultos foram observados apenas aos 35 dias. Após os

sete dias da inoculação, células gigantes foram observadas na região de maturação e se caracterizaram por um adensamento citoplasmático, hipertrofia de núcleos e nucléolos e pequena expansão celular. Aos 21 dias, as células gigantes eram mais volumosas e multinucleadas e muitas células parenquimáticas do cilindro vascular diferenciaram-se de forma anormal nos sítios das células gigantes, caracterizadas por espessamento de parede tipo reticulado.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*, *Phaseolus atropurpureus*, histopatologia

ABSTRACT

Histopathology of *Phaseolus atropurpureus* infected by *Meloidogyne javanica*

Penetration, distribution and nematode development in the root tissues and, particularly, the histological reactions of *Phaseolus atropurpureus* infected by *Meloidogyne javanica*, were studied at 1, 7, 13, 21, 28 e 35 days after inoculation. Larval penetration was observed within 24 hours after inoculation, preferably starting from the root tip. At seven and fourteen days, vermiform larvae were observed in the root tip and in the vascular cylinder of the maturation zone. At 21 days, nematode population increased in the central cylinder, where they became

sedentaries. Adult nematode were only observed after 35 days. Histological alterations were observed beginning at 7 days after inoculation. Giant cells occurred generally at the beginning of the maturation zone and were characterized by an increase in density of the cytoplasm, hypertrophy of the nuclei and nucleoli and cellular expansion. After 21 days, the giant cells were large and multinucleates. Abnormal differentiations of parenchym-cells of the vascular cylinder were frequent in the sites of giant cells, characterized by secondary thickening of the wall, characteristically the reticulated type.

* Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor. Trabalho realizado com apoio financeiro da EMBRAPA e CNPq.

INTRODUÇÃO

A resposta morfológica mais direta à infecção por *Meloidogyne* spp é a indução de galhas nas raízes de plantas hospedeiras. Mudanças hispatológicas que contribuem para a formação de galhas incluem: produção de células gigantes; hiperplasia do periciclo e parênquima xilemático; hipertrofia do córtex e parênquima xilemático; alterações no sistema vascular (Siddiqui & Taylor, 1970; Ogbuji, 1976).

Diversas combinações entre *Meloidogyne* spp e seus mais variados hospedeiros têm sido estudadas (Christie, 1936; Dropkin & Nelson, 1960; Baldwin & Barker, 1970), entretanto a histopatologia de *Phaseolus atropurpureus* (Moç & Sesse) ex Dc. com meloidoginose não foi anteriormente relatada. Assim, este trabalho objetivou estudar as reações do hospedeiro à penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885), Chitwood, 1949, nos tecidos radiculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *P. atropurpureus* foram tratadas com hipoclorito de sódio a 1% por um minuto e, em seguida, colocadas para germinar sobre papel de filtro umedecido, em placas de Petri. As plântulas obtidas foram, então, repicadas para copos de plástico de 250 ml, contendo areia previamente esterilizada por uma hora a 120°C. Quinze dias após a repicagem, quando as plantas apresentavam um sistema radicular com raízes principal, secundárias e terciárias, procedeu-se à inoculação com cerca de 4000 ovos de *M. javanica* por copo. O inóculo foi extraído de tomateiro pelo método de Hussey & Barker (1973).

Inocularam-se 12 plantas e outras 6 receberam apenas água esterilizada para serem como testemunhas. As plantas foram regadas diariamente e adubadas quinzenalmente com adubo foliar Rhodia-Jardim, formulação 16-6-8, mais micronutrientes.

As raízes das plantas foram coletadas aos 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação. As amostras foram lavadas e imersas em FAA (álcool etílico a 50% - 90 ml, ácido acético glacial - 5 ml e formalina comercial - 5 ml), sendo mantidas neste fixador por um período mínimo de 30 dias. Em seguida, as raízes foram retiradas e seccionadas a 15mm de suas extremidades e, então, subdivididas em três segmentos de 5mm, de acordo com sua posição e desenvolvimento. Estes segmentos foram processados, separadamente, conforme Jensen (1962). Para melhor visualização, as raízes finas foram coradas com fucsina ácida a 1%, na fase de fixação. As amostras foram montadas em blocos de parafina e, em seguida, seccionadas em micrótomo rotatório ("American Optics"). As secções obtidas, 15µm de espessura, foram coradas em safranina e "fast-green", de acordo com o procedimento de Jensen (1962) e observadas posteriormente ao microscópio de luz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Penetração e Desenvolvimento de *M. Javanica* - A penetração de larvas ocorreu na extremidade das raízes, a partir do primeiro dia de inoculação. Na Figura 1A observa-se larva de 2º estágio com a região labial voltada

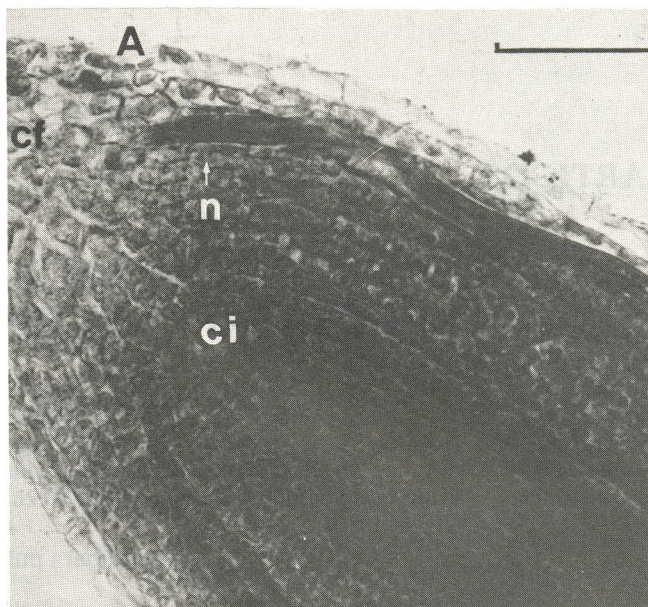


FIG. 1A Penetração de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Phaseolus atropurpureus*. A - Larva infectiva de segundo estágio, na extremidade radicular, um dia após a inoculação. As barras correspondem a 60µm.

para as células iniciais apicais. Aos sete dias da inoculação, foram observadas larvas no interior do cilindro vascular na região de maturação (Fig. 1B). Entretanto, ainda aos 14 dias, encontraram-se larvas junto às iniciais apicais do meristema. Similarmente às observações feitas por Smith & Mai (1965), em raízes de cebola infectadas por *M.*

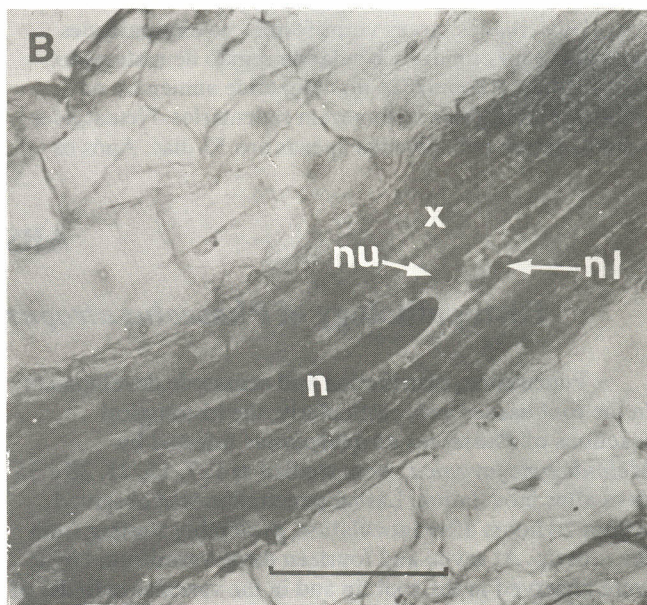


FIG. 1B Penetração de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Phaseolus atropurpureus*. B - Larva de 2º estágio no cilindro central, já na região de maturação, sete dias após a inoculação. As barras correspondem a 60µm.

hapla, as larvas de *M. javanica* aparentemente penetraram pela coifa, intercelularmente e obliquamente ao eixo das raízes de *P. atropurpureus*. Outros autores (Christie, 1936; Krusberg & Nielsen, 1958), também relataram a extremidade radicular como ponto preferencial de penetração da larva. As observações deste trabalho sugerem que no interior das raízes, as larvas de *M. javanica* migraram para as células iniciais apicais e, mais tarde, estabeleceram-se em sítios alimentares nas regiões de alongação e de maturação.

Após os 21 dias de inoculação, não mais se observaram larvas na extremidade radicular (mertistema apical). Entretanto, foram observadas feixes de larvas atingindo o cilindro central, na região de maturação, através de pontos de emissão de raízes. Na Figura 1C, observa-se, em uma raiz lateral, a penetração preferencial pela região meristemática. Aos 28 e 35 dias não se constataram larvas em fase de penetração, embora várias larvas vermiformes de segundo estágio tenham sido encontradas no córtex da região de maturação.

Larvas vermiformes de 2ª estágio foram observadas tanto na região meristemática quanto na região de maturação das raízes, em todos os períodos avaliados. Aos 21 dias, constatou-se o maior número de larvas de 2ª estágio nas raízes. A partir deste período observou-se larvas dilatadas na região de maturação, mas nematóides adultos só foram constatados 35 dias após a inoculação.

Reações Histológicas - Aos sete dias da inoculação, observaram-se alterações histológicas na região de maturação, que consistiram de células parenquimáticas do xilema com núcleos e nucléolos hipertrofiados e intensamente corados com safranina, sugerindo o início da formação de células gigantes, próximo à extremidade anterior do corpo das larvas (Fig. 1B). Algumas células

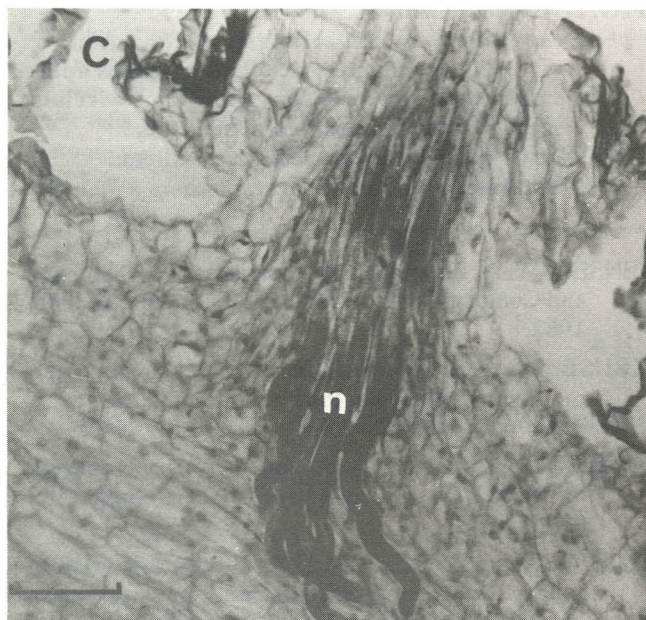


FIG. 1C Penetração de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Phaseolus atropurpureus*. C - Penetração de larvas infectivas, via raiz lateral, 21 dias após a inoculação. (ci = coifa; n = nematóide; nu = núcleo; nl = nucléolo). As barras correspondem a 60µm.

encontravam-se multinucleadas e com citoplasma denso (Fig. 2A). Aos 14 dias, também se observaram, no cilindro vascular, células multinucleadas em expansão e com

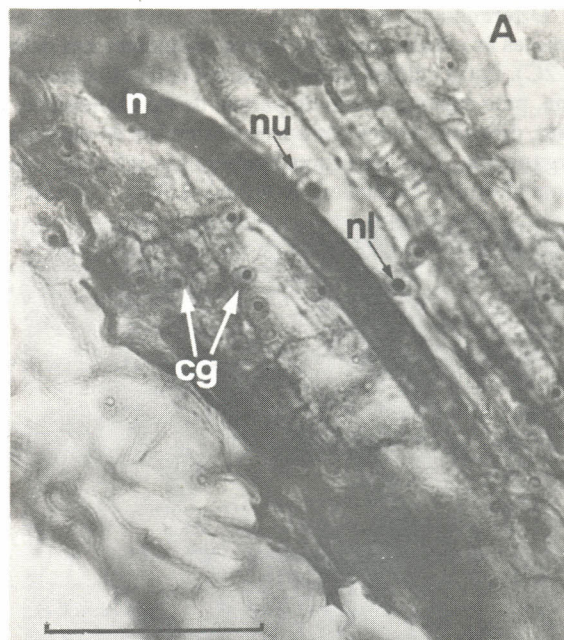


FIG. 2A Reações histológicas de raízes de *P. atropurpureus* à infecção por *M. javanica*. A - Estágio inicial da formação de células gigantes, sete dias após a inoculação.

citoplasma denso. Aos 21 dias, os corpos de muitos nematóides estavam dilatados e as células gigantes eram maiores do que aos 14 dias, com numerosos núcleos, massa citoplasmática densa e, em alguns casos, granulada (Fig. 2B). Os núcleos apresentaram diferentes tamanhos,

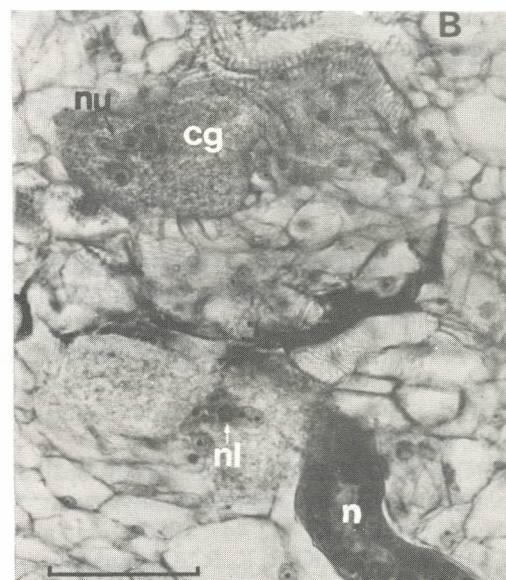


FIG. 2B Reações histológicas de raízes de *P. atropurpureus* à infecção por *M. javanica*. B - Células gigantes desenvolvidas, 21 dias após a inoculação.

com formas globosa, alongada, bastonetiformes ou com projeções. Os nucléolos eram hipertrofiados, com variação na forma e no tamanho.

Diferenciação anormal de células parenquimáticas adjacentes às células gigantes foram frequentes nas galhas (Fig. 2C). Estas células tinham aparência de elementos de xilema, pelo espessamento de parede de tipo reticulado. No entanto, diferiam destes por apresentarem-se de maneira desorganizada. Tais estruturas também são referidas como "xilema anormal" (Krusberg & Nielsen, 1958; Ogbuji,

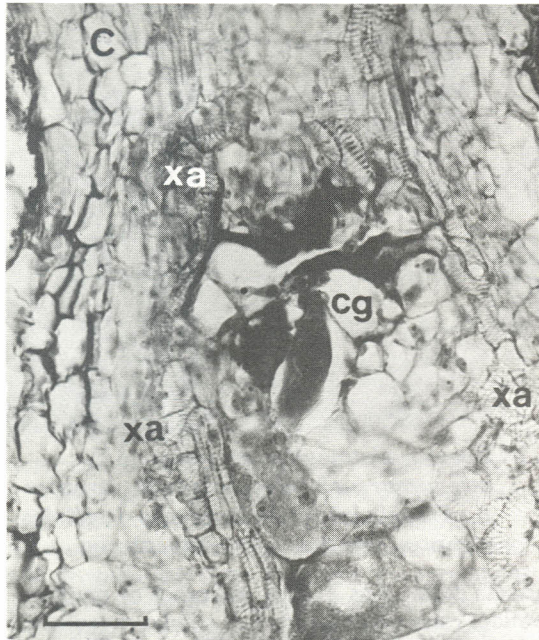


FIG. 2C Reações histológicas de raízes de *P. atropurpureus* à infecção por *M. javanica*. C - Diferenciação de células parenquimáticas em "xilema anormal", adjacentes as células gigantes.

1976). Aos 35 dias verificaram-se muitas células gigantes bastante vacuoladas e com paredes bem espessadas (Fig. 2D).

As reações histológicas descritas neste trabalho estão de acordo com diversos autores (Smith & Mai, 1965; Bird, 1974), os quais acreditam ser a formação das células gigantes um processo necessário para o estabelecimento bem sucedido na relação parasita-hospedeiro.

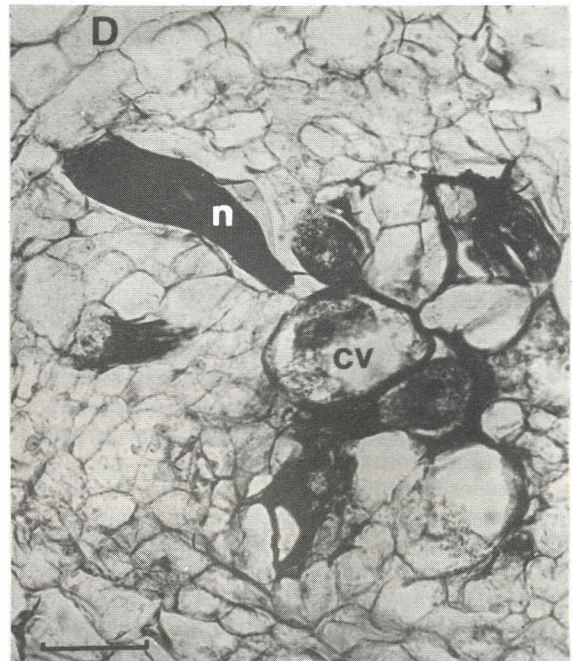


FIG. 2D Reações histológicas de raízes de *P. atropurpureus* à infecção por *M. javanica*. D - Células gigantes vacuoladas, 35 dias após a inoculação. (cg = células gigantes; cv = células gigantes vacuoladas; n = nematóide; nu = núcleo; nl = nucléolo; xa = xilema anormal). As barras correspondem a 60µm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, J. G. & BARKER, H. R. Histopathology of corn hybrids with root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Phytopathology* 60: 1195-1198. 1970.
- BIRD, A. F. Plant response to root-knot nematode. *Annual Review of Phytopathology* 12: 69-85. 1974.
- CHRISTIE, J. R. The development of root-knot nematode galls. *Phytopathology* 26: 1-22. 1936.
- DROPKIN, V. H. & NELSON, P. E. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology* 50: 442-447. 1960.
- HUSSEY, R. S. & BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp, including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028. 1973.
- JENSEN, W. A. *Botanical histochemistry*. W. H. Freeman and Company. San Francisco and London. pp. 408. 1962.
- KRUSBERG, L. R. & NIELSEN L. W. Pathogenesis of root-knot nematode to the Puerto Rico variety of sweet-potato. *Phytopathology* 48: 30-39. 1958.
- OGBUJI, R. O. Giant cell formation in corn roots caused by *Meloidogyne hapla* infection. *Nematologica* 22: 62-64. 1976.
- SIDDIQUI, I. A. & TAYLOR, D. P. Histopathogenesis of galls induced by *Meloidogyne naasi* in wheat roots. *Journal of Nematology* 2: 239-247. 1970.
- SMITH, J. J. & MAI, W. F. Host-parasite relationships of *Allium cepa* and *Meloidogyne hapla*. *Phytopathology* 55: 693-697. 1965.