

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Paulo Sergio dos Santos

RESPOSTA BIOQUÍMICA DE CULTIVARES DE SOJA À *Meloidogyne javanica*

Santa Maria, RS
2020

Paulo Sergio dos Santos

RESPOSTA BIOQUÍMICA DE CULTIVARES DE SOJA À *Meloidogyne javanica*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia.**

Orientador: Prof. Dr. Ivan Francisco Dressler da Costa

Santa Maria, RS
2020

Dos Santos, Paulo Sergio
RESPOSTA BIOQUÍMICA DE CULTIVARES DE SOJA À
Meloidogyne javanica / Paulo Sergio Dos Santos.- 2020.
65 p.; 30 cm

Orientador: Ivan Francisco Dressler da Costa
Coorientador: Ricardo Silveiro Balardin Balardin
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2020

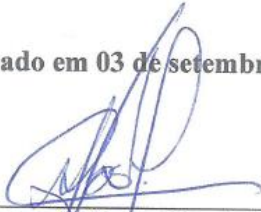
1. Resposta bioquímica 2. Cultivares de Soja 3.
Meloidogyne javanica 4. Indutores de defesa 5. Estresse
oxidativo I. Francisco Dressler da Costa , Ivan II.
Balardin , Ricardo Silveiro Balardin III. Título.

Paulo Sergio dos Santos

RESPOSTA BIOQUÍMICA DE CULTIVARES DE SOJA À *Meloidogyne javanica*

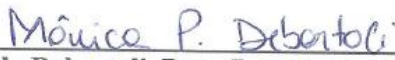
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia.**

Aprovado em 03 de setembro de 2020:


Ivan Francisco Dressler da Costa, Dr. (UFSM) – Videoconferência
(Presidente/Orientador)


José Domingos Jacques Leão, Dr. (UFSM) – Videoconferência


Jansen Rodrigo Pereira Santos, Dr. (UFSM) – Videoconferência


Mônica Paula Debortoli, Dra. (I. PHYTUS) – Videoconferência


Marcelo Grippa Madalosso, Dr. (URI) – Videoconferência

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente nessa caminhada.

A minha família, mãe Elza Souza dos Santos, pai Sebastião Virgílio dos Santos irmãos Tânia Mara dos Santos e Maurício Fagner dos Santos, por todo carinho, amor, apoio e compreensão. Ao meu tio José de Aguiar Portela por todos os ensinamentos, apoio e inúmeros conselhos para seguir em frente nessa caminhada. As minhas tias Ivani de Aguiar Portela e Lenira Souza dos Santos por toda ajuda durante esse período. Ao meu cunhado, Hoffineias dos Santos, por toda motivação, paciência e amizade.

Aos amigos, Caroline Gulart, Juliano Perlin, Simone Ferreira da Silva, Diogo Patias, Grazielli Lidtke, Simone G. Minuzzi e Andrezza Lopez, por toda a motivação, pelos conselhos e pela amizade.

A minha namorada, Gracieli Rebelatto, e a sua família por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e difíceis dessa jornada.

Aos Professores Ricardo Silveiro Balardin e Ivan F. Dressler pela orientação pelos inúmeros ensinamentos, pela amizade e pelo apoio, que me possibilitaram crescer pessoalmente e profissionalmente.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela possibilidade de execução desse projeto. Ao Instituto Phytus por me acolher e dar suporte e estrutura para a condução dos ensaios.

Aos pesquisadores do Instituto Phytus, Caroline Gulart, Mônica Debortoli, Nédio Tormen, Cristiano Bellé.

A todos os amigos que fiz durante esses anos de pesquisa no Instituto Phytus. Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e não foram aqui lembrados, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

RESPOSTA BIOQUÍMICA DE CULTIVARES DE SOJA À *Meloidogyne javanica*

AUTOR: Paulo Sergio dos Santos

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ivan F. Dressler da Costa

A indução de resistência vem sendo utilizada no controle de pragas e doenças em plantas. Os mecanismos de defesa podem ser ativados por agentes orgânicos ou inorgânicos, reduzindo os impactos causados por esses organismos nas culturas de importância agrícola. Os estudos apresentados nesta tese objetivaram elucidar os possíveis efeitos de *Bacillus amyloliquefaciens* e Piraclostrobina, na indução de resistência em cultivares de soja, frente ao nematoide-das-galhas *Meloidogyne javanica*. Além disso, estudou-se em curso temporal as respostas bioquímicas das cultivares de soja, analisando a interação inicial planta/nematoide utilizando enzimas antioxidantes como marcadores de estresse oxidativo. Ambos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação. No primeiro estudo, o efeito da utilização de *B. amyloliquefaciens* e Piraclostrobina na indução de resistência foi investigado com base em parâmetros vegetativos de estatura de plantas, massa fresca e seca da parte aérea das plantas, massa fresca de raiz, número de galhas, número de nematoides por grama de raiz e fator de reprodução. A partir disso, foi verificado que ambos os indutores proporcionaram redução do número de galhas, número de nematoides por grama de raiz e fator reprodução nas cultivares BMX-Ícone IPRO, BMX-Ativa RR, SYN-Vtop RR e NA-5909 RG. No segundo estudo foram desenvolvidos dois experimentos; o primeiro com o objetivo de investigar, em horas, a resposta do complexo antioxidante da cultivar de soja BMX-Ativa RR inoculada com três densidades populacionais de *M. javanica* (0, 50, 5000 e 10000 juvenis + ovos) submetidas a cinco períodos de exposição (1, 2, 6, 12 e 48 horas após inoculação). O segundo experimento foi composto por quatro cultivares de soja (BMX-Ativa RR, NA-5909 RG, SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO), quatro intervalos de coleta (6, 12, 24 e 48 horas), com inoculação de 2.500 juvenis de *M. javanica* e sem inoculação de nematoide. Para confirmar a resposta do complexo antioxidante decorrente da interação nematoide/planta, foi realizada a coloração de raízes nos respectivos tempos de coleta para possibilitar a contagem do número de nematoides juvenis penetrados. Os parâmetros avaliados em ambos os experimentos (1 e 2) foram: as enzimas antioxidantes peroxidase de fenóis (POX) e ascorbato peroxidase (APX), as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Malondialdeídos (MDA) e o número de juvenis de *M. javanica* penetrados. No experimento 1, plantas de soja na presença de *M. javanica* apresentaram aumento significativo na concentração de H_2O_2 , variando em relação às densidades populacionais e aos tempos de coleta e promovendo a atividade das enzimas peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX). No experimento 2, a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) variou entre as cultivares com e sem inoculação e nos diferentes tempos de coleta. Esses eventos foram evidenciados pela concentração de Malondialdeídos (MDA) e a atividade das enzimas antioxidantes POX e APX, indicando uma resposta rápida do hospedeiro quanto à infecção por *M. javanica*. O estresse oxidativo causado por *M. javanica* não variou entre cultivares de soja, independentemente do fator de reprodução do nematoide das cultivares, entretanto, as respostas das enzimas antioxidantes POX e APX ocorreram conforme o fator de reprodução das cultivares.

Palavras-chave: *Glycine max*. Nematoide-das-galhas. Estresse Oxidativo. Indução de Defesa. Manejo de Nematoides.

ABSTRACT

BIOCHEMICAL RESPONSE OF SOYBEAN CULTIVARS TO *Meloidogyne javanica*

AUTHOR: Paulo Sergio dos Santos

ADVISOR: Prof. Dr. Ivan F. Dressler da Costa

Induction of resistance has been used to control pests and plant diseases. Defense mechanisms can be activated by organic or inorganic agents, reducing the impacts caused by these organisms in crops of agricultural importance. The studies presented in this thesis aimed to elucidate the possible effects of *Bacillus amyloliquefaciens* and Piraclostrobin in induction of resistance in soybean cultivars against root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. In addition, we studied the time course of biochemical responses of the soybean cultivars, analyzing the initial interaction plant/nematode and using antioxidant enzymes as markers of oxidative stress. Both experiments were conducted in a greenhouse. In the first study, the effect of using *B. amyloliquefaciens* and Piraclostrobin on induction resistance was investigated based on vegetative parameters of plant height, fresh and dry weight of the aerial part of the plants, fresh root weight, number of galls, number of nematodes per gram of root and reproduction factor. From this, it was found that both inductors provided a reduction in the number of galls, number of nematodes per gram of root and reproduction factor in the cultivars BMX-Ícone IPRO, BMX-Ativa RR, SYN-Vtop RR and NA-5909 RG. In the second study, two experiments were developed; the first with the objective of investigating, in hours, the response of the antioxidant complex of the soybean cultivar BMX-Ativa RR inoculated with three population densities of *M. javanica* (0; 50; 5,000 and 10,000 nematodes + eggs) submitted to five periods of exposure (1, 2, 6, 12 and 48 hours after inoculation). The second experiment consisted of four soybean cultivars (BMX-Ativa RR, NA-5909 RG, SYN-Vtop RR and BMX-Icon IPRO), four collection intervals (6, 12, 24 and 48 hours), with inoculation of 2,500 juveniles of *M. javanica* and without nematode inoculation. To confirm the response of the antioxidant complex resulting from the nematode / plant interaction, root staining was performed at the respective collection times to enable counting the number of juvenile nematodes penetrated. The parameters evaluated in both experiments were: the antioxidant enzymes peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APX), the concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) and Malondialdehydes (MDA) and the number of juveniles of *M. javanica* penetrated. In experiment 1, soybean plants in the presence of *M. javanica* showed a significant increase in the concentration of H₂O₂, varying in relation to population densities and collection times and promoting the activity of the enzymes peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APX). In experiment 2, the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) varied between cultivars with and without inoculation and at different collection times. These events were evidenced by the concentration of Malondialdehydes (MDA) and the activity of antioxidant enzymes POX and APX, indicating a rapid response from the host to infection by *M. javanica*. Oxidative stress caused by *M. javanica* did not vary among soybean cultivars, regardless of their reproduction rate, however the responses of antioxidant enzymes POX and APX occurred as reproduction factor of cultivars.

Keywords: *Glycine max*. Root-Knot nematode. Oxidative Stress. Defense Induction. Nematode Management.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- Tabela 1 – Tratamentos utilizados no estudo, princípios ativos e doses. Itaara - RS, 2018.... 31
- Tabela 2 – Estatura de plantas (cm) avaliadas aos 15 e 30 DAI; Massa Fresca e Seca de Parte Aérea (MFPA; MSPA) e Massa Fresca de Raiz (MFR) tratadas com indutores de resistência 7 dias após inoculação. Itaara - RS, 2018. 32
- Tabela 3 – Número de Galhas (NG), Nematóide por Grama de Raiz (NGR) e Fator de Reprodução (FR) tratados com indutores de resistência 7 dias após inoculação. Itaara - RS, 2018. 34
- Tabela 4 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis Estatura de plantas (cm), avaliadas aos 15 e 30 DAI, Massa Fresca e Seca de Parte Aérea (MFPA; MSPA), Massa Fresca de Raiz (MFR), Número de Galhas (NG), Nematóide por Grama de Raiz (NGR) e Fator de Reprodução (FR) tratadas com indutores de resistência 7 dias após inoculação. Itaara - RS, 2018. 35

Artigo 2

- Tabela I – Atividade enzimática de Peroxidase (POX), Ascorbato Peroxidase (APX), concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Malondialdeído (MDA) em plantas de soja submetidas a três densidades populacionais de *M. javanica* avaliadas em diferentes períodos após inoculação. Itaara - RS, 2019. 58
- Tabela II – Atividade enzimática das peroxidase (POX), Ascorbato peroxidase (APX), e a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e Malondialdeído (MDA) em diferentes cultivares de soja em diferentes períodos após inoculação de *M. javanica*. Itaara - RS, 2019. 59
- Tabela III – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis Fator de Reprodução (FR), Peroxidase de Fenóis (POX), Ascorbato Peroxidase (APX), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), Malondialdeídos (MDA), Número de juvenis Penetrados às 6 horas (NP 6 horas), Número de juvenis Penetrados às 12 horas (NP 12 horas), Número de juvenis Penetrados às 24 horas (NP 24 horas) e Número de juvenis Penetrados às 48 horas (NP 48 horas). Itaara - RS, 2019. 61

LISTA DE FIGURAS

Artigo 2

- Figura 1 – Média de penetração de juvenis de *Meloidogyne javanica* em cultivares de soja em diferentes tempos de coleta após inoculação. Itaara – RS, 2019. 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAI	Dias Após Inoculação
POX	Peroxidase de Fenóis
APX	Ascorbate Peroxidase
ERO _s	Espécies Reativas de Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
MDA	Malondialdeídos
FR	Fator de Reprodução
NP	Nematoídes Penetrados
HAI	Horas Após Inoculação
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
RSI	Resistência Sistêmica Induzida
RH	Reação de Hipersensibilidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. ARTIGO 1 – EFEITO DE <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> E PIRACLOSTROBINA NO MANEJO DE <i>MELOIDOGYNE JAVANICA</i> NA CULTURA DA SOJA	15
RESUMO	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	23
CONCLUSÕES	27
LITERATURA CITADA	28
3. ARTIGO 2 - ESTRESSE OXIDATIVO EM CULTIVARES DE SOJA EM RESPOSTA AO PARASITISMO POR <i>Meloidogyne javanica</i>	36
Resumo	36
1. Introdução	37
2. Materiais e Métodos	39
2.1 Ensaio 1 - Densidade populacional <i>versus</i> resposta oxidativa	39
2.2.1 Inoculação de <i>Meloidogyne javanica</i>	40
2.1.2 Análises Bioquímicas	40
2.1.2.1 Determinação da Atividade da Enzima Peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)	41
2.1.2.2 Determinação da Atividade da Enzima Ascorbato Peroxidase (APX, EC: 1.11.1.1) ..	41
2.1.2.3 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	42
2.1.2.4 Concentração de Malondialdeído (MDA)	42
2.1.3 Análise Estatística	43
3. Ensaio 2 – Respostas bioquímicas de cultivares	43
3.1 Inoculação de <i>Meloidogyne javanica</i>	44
3.2 Análise de nematoide penetrados	44
3.3 Análise Estatística	45
4. Resultados	45
5. Discussão	49
6. Conclusões	53
7. Referências	54
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a cultura mais importante no Brasil. Essa oleaginosa ocupa mais de 30 milhões de hectares, e o Brasil consolida-se como um dos maiores exportadores mundiais do complexo soja, levando em consideração a soma dos negócios de grãos, farelos e óleos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2017). A cultura da soja apresentou rápida e significativa expansão no Brasil, no entanto, simultaneamente a esse processo, foi observado crescente aumento nos problemas fitossanitários, com registros de mais de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, o que compromete os altos rendimentos da cultura (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2006).

Dentre esses grupos de patógenos, destacam-se os fitonematoides, microrganismos habitantes naturais do solo que possuem a capacidade de se alimentar diretamente no sistema radicular das plantas de soja, comprometendo o desenvolvimento e reduzindo, assim, a produtividade (AGRIOS, 2005; DIAS et al., 2010; TIHOHOD, 2000). Estimativas apontam que os prejuízos causados por esses microrganismos, em escala global, já ultrapassam a casa de US\$ 100 milhões anuais (FERRAZ, B. et al., 2001; MCCARTER, 2009; SASSER; FRECKMAN, 1987).

No Brasil, várias são as espécies associadas à redução ou ao aumento no custo da produção na cultura da soja (DIAS et al., 2010). Porém, destaca-se que o nematoide-das-galhas *Meloidogyne javanica* (TREUB, 1885) CHITWOOD, 1949, espécie amplamente distribuída em todos os estados produtores, possui um alto grau de polifagia (capacidade de se alimentar de plantas de diferentes famílias botânicas), podendo ocasionar perdas significativas à cultura (DIAS et al., 2010; FERRAZ, S. et al., 2010).

Os principais métodos de controle recomendados para o manejo de *M. javanica* baseiam-se na aplicação de nematicidas, químicos ou biológicos, via tratamento de sementes ou sulco de semeadura; na utilização de variedades resistentes e na rotação de culturas com plantas não hospedeiras (ARAÚJO; BRAGANTE; BRAGANTE, 2012). Apesar dessas opções para o manejo, a eficiência desses métodos é frequentemente questionável quando utilizados isoladamente. Em virtude disso, a adoção de medidas integradas para o controle desse nematoide faz-se necessária.

Na busca por novas alternativas de controle eficientes, de caráter associativo às ferramentas já existentes, com características que não ocasionem efeitos negativos para o

meio ambiente e para o homem e sejam de fácil implementação, a indução de resistência de plantas tem sido considerada uma proposta extremamente promissora, pois apresenta vantagens como efetividade contra diversos patógenos, estabilidade - devida à ação de diferentes mecanismos de resistência - e caráter sistêmico.

Em suma, essa técnica consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes, existentes nas plantas, em resposta ao tratamento com agentes orgânicos ou inorgânicos. Nesse processo, as plantas são expostas a um agente indutor, e seus tecidos reagem mais rapidamente e com mais eficiência às tentativas de colonização por um patógeno virulento (ROMEIRO, 2007). Existem dois principais mecanismos de resistência que governam esse processo: a Resistência Sistêmica Adquirida SAR (“Systemic Acquired Resistance”) e a Resistência Sistêmica Induzida ISR (“Induced Systemic Resistance”).

A SAR apresenta o acúmulo de Proteínas Relacionadas com Patogênese (PRPs) como o principal mecanismo indutor de defesa em plantas, sendo sua via de sinalização o salicilato-dependente (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997, ROMEIRO, 2000, 2007). No caso da ISR, a rota de sinalização está associada à jasmonato e etileno, não havendo acúmulo de PRPs.

As principais respostas de defesa envolvidas por esses mecanismos passam pela morte programada de células, a Reação de Hipersensibilidade (RH), a produção de metabólitos secundários antimicrobianos (fitoalexinas) e a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) (FARIA et al., 2003; OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016).

No tocante a isso, a expressão fenotípica de resistência das plantas a nematoides geralmente é caracterizada pela RH, que consiste na morte programada de células no local da infecção, limitando, assim, o seu desenvolvimento e a sua reprodução (WILLIAMSON, 1999). Em nível bioquímico, essa complexa interação nematoide-planta é condicionada a um aumento significativo na concentração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como superóxido (O_2^-), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), sendo a primeira resposta da planta ao ataque (MELILLO et al., 2006).

Esse acúmulo de EROs nas células vegetais pode ser tóxico para ambos (planta e nematoides). No entanto, nas plantas, as EROs podem reagir como moléculas biológicas, ocasionando danos irreversíveis às membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos (APEL; HIRT, 2004). Embora esse acúmulo de EROs possa inicialmente contribuir para a resistência aos nematoides (KYNDT et al., 2012), as plantas desenvolveram mecanismos não enzimáticos e enzimáticos (APEL; HIRT, 2004) capazes de remover o excesso de EROs

gerado durante a interação patógeno-hospedeiro. Tais mecanismos desempenham um papel fundamental na resistência a doenças de plantas.

Dentre as enzimas envolvidas no processo de desintoxicação, destacam-se a Peroxidase de Fenóis (POX) e a Ascorbato Peroxidase (APX), que estão comumente envolvidas nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o estresse oxidativo e são especialmente importantes na desintoxicação do H_2O_2 na célula, prevenindo ou minimizando os danos oxidativos (MITTLER, 2002; SHARMA et al., 2012).

Entretanto, a grande maioria dos trabalhos de indução de resistência relaciona-se comumente às doenças foliares, sendo dada pouca atenção à indução contra patógenos do sistema radicular, como os fitonematoides. Tal desatenção ocorre apesar de alguns trabalhos terem comprovado o aumento da resistência de plantas a esses microrganismos em diferentes patossistemas (DIAS-ARIEIRA et al., 2013).

Com base no exposto, esta tese apresenta dois artigos que elucidam os trabalhos que foram desenvolvidos com a finalidade de demonstrar os possíveis efeitos da rizobactéria *Bacillus amyloliquefaciens* e do fungicida Piraclostrobina na indução de resistência em cultivares de soja frente ao nematoide-das-galhas *M. javanica*. Além disso, foram observadas, em curso temporal, as respostas bioquímicas das cultivares de soja, analisando a interação inicial planta-nematoide com a utilização de enzimas antioxidantes como marcadores de estresse oxidativo.

Artigo 1 (Será submetido a revista Nematropica)

2. ARTIGO 1 – EFEITO DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* E PIRACLOSTROBINA NO MANEJO DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* NA CULTURA DA SOJA

Paulo Sergio dos Santos^{1*}, Ivan F. Dressler da Costa¹, Cristiano Bellé², Gracieli Rebelatto¹,
Andrezza Lopez², Leonardo Furlani¹

¹Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, n.º 1000, Camobi, RS, 97105-900, Brasil.

²Instituto Phytus, Itaara, 97105-900, Brasil.

*Autor para correspondência: e-mail: paulosbio@gmail.com

RESUMO

Santos, P. S., I. F. D. Costa, C. Bellé, G. Rebelatto, A. Lopez, L. Furlani. Efeito de *bacillus amyloliquefaciens* e piraclostrobina no manejo de *Meloidogyne javanica* na cultura da soja. Nematropica.

Os nematoides-das-galhas limitam a produtividade da cultura da soja. Esses parasitas são de difícil controle, necessitando da integração de várias estratégias de manejo. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de indutores de resistência no manejo de *M. javanica* em quatro cultivares de soja. Para tanto, foram estudados os indutores *Bacillus amyloliquefaciens* e Piraclostrobina. O experimento foi conduzido em arranjo bifatorial (4 x 3), composto por quatro genótipos de soja sendo a BMX – Ícone IPRO, BMX-Ativa RR, SYN-Vtop RR e NA-5909 RG todas suscetíveis à *M. javanica*. Cada indutor foi aplicado isoladamente uma hora após a inoculação, através da pulverização foliar. Plantas inoculadas e tratadas com água foram utilizadas como controle. Os efeitos nos parâmetros vegetativos foram variáveis entre as cultivares e os indutores, no entanto, os melhores resultados foram

observados para os tratamentos com o indutor *B. amyloliquefaciens* no parâmetro de estatura de plantas. O indutor *B. amyloliquefaciens* promoveu a redução no número de galhas, número de nematoides/grama de raiz e fator de reprodução, variando de 6,67% a 31,58%; 11,69% a 50,90% e 8,08% a 39,07%, respectivamente. Para Piraclostrobina, verificou-se redução nos mesmos parâmetros, variando de 8,89% a 45,45%; 14,18% a 50,03% e 16,83% a 45,16%, respectivamente. De maneira geral, os indutores interferiram na reprodução de *M. javanica* nas diferentes cultivares de soja.

Palavras-chave: *Glycine max*, Nematóide-das-galhas, Indução de Defesa.

INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp. Göldi, 1887) são considerados o gênero de maior importância econômica no mundo. Sua habilidade de parasitar todos os tipos de culturas de importância econômica, incluindo a cultura da soja (*Glycine max* (L)), associada à sua ampla distribuição geográfica, os colocam como grupo de maior risco para a agricultura mundial (Agrios, 2005; Dias *et al.*, 2010; Tihohod, 2000).

Atualmente o gênero *Meloidogyne* possui mais de 100 espécies já descritas (Hunt; Handoo, 2009). No Brasil, várias são as espécies associadas ao aumento no custo da produção na cultura da soja (Dias *et al.*, 2010). Entretanto, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 apresenta-se amplamente disseminado, com relatos em praticamente todos os estados produtores do Brasil, ocasionando perdas significativas, na ordem de 30%, podendo impactar até 100% da produção dependendo do nível de infestação (Dias *et al.*, 2010; Ferraz, S. *et al.*, 2010).

Os principais métodos de controle baseiam-se na aplicação de nematicidas, químicos ou biológicos, via tratamento de sementes ou sulco de semeadura; na utilização de variedades resistentes e na rotação de culturas com plantas não hospedeiras (Araújo *et al.*, 2012).

O uso de nematicidas para o controle de *M. javanica* em soja configura-se como uma prática onerosa, que está ficando cada vez mais restrita, o que se deve, principalmente, à sua alta toxicidade ao meio ambiente e a possíveis riscos à saúde humana (Dong e Zhang, 2006). A utilização de genótipos com resistência à *M. javanica* é um método eficiente para conter as perdas decorrentes do ataque desse nematoide; entretanto, a maioria dos genótipos de soja cultivados no Brasil tem apresentado histórico de suscetibilidade a tal nematoide (Ferraz, B. *et al.*, 2001; Roese *et al.*, 2004).

Por sua vez, a rotação de culturas é um dos métodos mais recomendados nos diferentes sistemas de produção, pois restringe a multiplicação dos nematoides, causando a sua redução no solo. Contudo, em nematoides que possuem uma ampla gama de hospedeiros, como é o caso de *M. javanica*, muitas vezes o controle por meio dessa prática acaba sendo comprometido (Ferraz, S. *et al.*, 2010).

Na busca por novas alternativas de controle que não ocasionem efeitos negativos para o meio ambiente e para o homem, além de serem de fácil implementação, a indução de resistência tem sido considerada uma proposta extremamente promissora, apresentando vantagens, tais como: efetividade contra diversos patógenos, caráter sistêmico, e estabilidade - devida à ação de diferentes mecanismos de resistência.

Em suma, essa técnica consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes, existentes nas plantas, em resposta ao tratamento com agentes orgânicos ou inorgânicos. Nesse processo, as plantas são expostas a um agente indutor, e seus tecidos reagem mais rapidamente e com mais eficiência às tentativas de colonização por um patógeno virulento (Romeiro, 2007). Os principais mecanismos envolvidos incluem a morte programada de células - Reação de Hipersensibilidade (RH) -, a produção de metabólitos secundários antimicrobianos (fitoalexinas) e a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) (Faria *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2016).

Entretanto, a grande maioria dos trabalhos de indução de resistência relaciona-se comumente às doenças foliares, sendo dada pouca atenção à indução contra patógenos do sistema radicular, como os fitonematoides. Tal desatenção ocorre apesar de alguns trabalhos terem comprovado o aumento da resistência de plantas a esses microrganismos em diferentes patossistemas (Kloepper *et al.*, 2004; Dias-Arieira *et al.*, 2013; Puerari *et al.*, 2013; Molinari, 2015; Chaves *et al.*, 2016; Soares e Dias-Arieira, 2020). Assim, tendo em vista a escassez de pesquisas sobre o uso de indutores de resistência no controle de *M. javanica*, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de *Bacillus amyloliquefaciens* e Piraclostrobina no manejo de *M. javanica* em quatro cultivares de soja com diferentes níveis de suscetibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação em Itaara, Rio Grande do Sul localizado em latitude 29°35'8"S, longitude 53°48'28"O e altitude de 444m, na safra 2018-2019. As temperaturas máximas e mínimas registradas dentro da casa de vegetação foram 28°C e 19 C°, respectivamente.

A semeadura ocorreu de forma direta, em vasos com capacidade de 2,8 litros, que foram preenchidos com substrato previamente esterilizado composto por areia e solo na proporção de 1:1. As características químicas e físicas do substrato foram as seguintes: potencial de hidrogênio (pH = 5.2), matéria orgânica (M.O = 1,1), capacidade de troca catiônica (CTC = 5,8), teor de argila (11%), silte (4%) e areia tipo 1 (85%). Para cada vaso foram semeadas três sementes de soja sem tratamento químico; após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste, deixando uma plântula por vaso.

O delineamento foi inteiramente casualizado, composto por quatro cultivares de soja - BMX-Ícone IPRO, BMX-Ativa RR, SYN-Vtop RR e NA 5909 RG - e três tratamentos via aplicação foliar no estágio V2. Os tratamentos foram compostos por (1) uma testemunha com

aplicação de água, (2) aplicação de *B. amyloliquefaciens* (Integral®) e (3) aplicação de Piraclostrobina (Comet®), configurando um esquema bifatorial 4 x 3 com 5 repetições, conforme detalhado na (Tabela 1). As cultivares de soja foram escolhidas por apresentarem níveis de multiplicação variados à *M. javanica*. Plantas inoculadas e tratadas com água foram utilizadas como controle.

O inóculo de *M. javanica* foi proveniente de raízes de plantas de soja infectadas do município de Júlio de Castilhos - RS. Após a confirmação da espécie, através do padrão perineal de 10 fêmeas, e a caracterização bioquímica, por meio do fenótipo de esterase (Carneiro e Almeida, 2001), massas de ovos foram coletadas e inoculadas em plantas de tomateiro cultivar híbrido “Apolo F 1” visando à multiplicação do nematoide. Após 120 dias, as plantas de tomateiro foram coletadas e o inóculo foi preparado de acordo com as técnicas de extração de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz, S. (1981).

A inoculação dos tratamentos foi realizada no estágio fenológico V2, através da abertura de três orifícios no solo, em distância de 2 centímetros do colo das plantas e com 2 centímetros de profundidade, sendo inoculada uma população correspondente a 5.000 juvenis + ovos de *M. javanica* por vaso. As aplicações dos tratamentos ocorreram uma hora após a inoculação, sob uma vazão de 150 L/ha, utilizando um sistema de pulverizador pressurizado a CO₂ ajustado a uma pressão de 30 Psi. Momentos antes da aplicação, o solo de cada vaso foi coberto com papel no intuito de evitar o contato direto dos produtos junto ao solo para impedir qualquer contato direto com o alvo do estudo.

As variáveis medidas no experimento foram: estatura de plantas aos 15 e 30 dias após a inoculação (DAI); massa fresca de parte aérea (MFPA) aos 60 dias após inoculação (DAI); massa seca de parte aérea (MSPA) e massa fresca de raiz (MFR) aos 60 DAI. Para as avaliações de nematoides, decorridos 60 dias após a inoculação, as raízes de cada planta foram separadas da parte aérea e avaliadas quanto ao número de galhas (NG). Em seguida, foi

realizada a extração de juvenis + ovos de *M. javanica* das raízes de cada planta, conforme metodologia de Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz (1981), para quantificação e determinação do fator de reprodução do nematoide (FR = população final/população inicial) em cada repetição (Oostenbrink, 1966).

Os valores das diferentes variáveis obtidas em cada repetição foram submetidos à análise de variância, sendo as médias de cada tratamento comparadas entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o *software* AgroEestat (Barbosa e Maldonado Júnior, 2015).

RESULTADOS

Os resultados indicaram que houve diferença significativa do fator cultivar dentro de cada tratamento nas variáveis de estatura de plantas e massa seca de parte aérea (MSPA) aos 15 e 30 DAI. Já para as variáveis de massa fresca de parte aérea (MFPA) e massa fresca de raiz (MFR), apenas a testemunha não apresentou diferença significativa nessa comparação (Tabela 2). Comparando o fator tratamento, houve significância entre o indutor Piraclostrobina para cultivar SYN-Vtop RR, para os parâmetros de estatura aos 15 DAI e em todas as cultivares aos 30 DAI. Para a variável massa seca de parte aérea (MSPA), *B. amyloliquefaciens* aplicado na cultivar SYN-Vtop RR apresentou diferença significativa em relação à testemunha e Piraclostrobina. Na variável de massa fresca de raiz (MFR), houve diferença significativa para os tratamentos com Piraclostrobina na cultivar SYN-Vtop RR e com *B. amyloliquefaciens* na cultivar NA-5909 RG (Tabela 2).

Nas variáveis de nematoides, quando comparadas as cultivares dentro de cada tratamento, houve diferença significativa em todos os parâmetros avaliados: número de galhas (NG), nematoide por grama de raiz (Nema/g) e fator de reprodução (FR). Analisando o fator tratamento, houve respostas significativas para ambos os indutores (*B. amyloliquefaciens* e

Piraclostrobina) nas variáveis número de galhas, nematoides por grama (Nema/g) e fator de reprodução (FR) nas cultivares NA-5909 RG, SYN-Vtop RR e BMX-Ativa RR (Tabela 3). Para as variáveis número de galhas, nematoide por grama de raiz e fator de reprodução, foi observada interação significativa entre os fatores cultivar e indutores.

Os tratamentos não tiveram efeitos significativos sobre os parâmetros vegetativos de estatura de plantas e massa fresca de parte aérea, apesar de os tratamentos compostos pelo elicitor *B. amyloliquefaciens* apresentarem incrementos numéricos em relação à testemunha, ao contrário do observado para o indutor Piraclostrobina (Tabela 2). Para massa seca de parte aérea e massa fresca de raiz, foi observada uma tendência similar de resposta, visto que o tratamento com o indutor *B. amyloliquefaciens* proporcionou os melhores resultados de incrementos na cultivar SYN-Vtop RR, para a primeira variável, e na cultivar NA-5909 RG para a segunda variável, sendo esses valores significativos em relação à testemunha (Tabela 2).

O número de galhas foi reduzido numericamente em todas as cultivares com aplicação dos indutores *B. amyloliquefaciens* (6,67% a 31,58%) e Piraclostrobina (8,89% a 45,45%) em comparação à testemunha, respectivamente, sendo significativo para a cultivar NA-5909 RG (Tabela 3). Na avaliação da densidade populacional de *M. javanica* por grama de raiz foi observada uma tendência similar de resposta, na qual as cultivares tratadas com *B. amyloliquefaciens* tiveram reduções significativas nas cultivares BMX-Ativa RR (26,78%) e NA-5909 RG (50,90%). No tratamento com Piraclostrobina, as maiores reduções chegaram a 49,20% e 50,03% nas cultivares SYN-Vtop RR e NA-5909 RG, diferindo da testemunha, respectivamente (Tabela 3).

O fator de reprodução de *M. javanica* foi reduzido em todas as cultivares de soja tratadas com os indutores. As maiores reduções no tratamento com *B. amyloliquefaciens* foram observadas nas cultivares BMX-Ativa RR (23,10%), SYN-Vtop RR (17,84%) e NA-

5909 RG (39,07%). No tratamento com Piraclostrobina, as maiores reduções ocorreram nas mesmas cultivares: (BMX-Ativa RR (16,83%), SYN-Vtop RR (32,60%) e NA-5909 RG (45,16%), diferindo significativamente da testemunha (Tabela 3).

Nos resultados do teste de correlação (conforme coeficientes de correlação descritos na Tabela 4) entre as variáveis estatura 15 e 30 DAI, massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR), número de galhas (NG), nematoide por grama (Nema/g) e fator de reprodução (FR), notou-se que houve correlação positiva e significativa da estatura de plantas das cultivares aos 15 DAI em relação à estatura aos 30 DAI ($r= 0,96^{**}$), indicando um padrão de crescimento das cultivares (Tabela 4). Apesar dessa alta correlação, não houve uma resposta na mesma direção para os demais parâmetros vegetativos (MFPA, MSPA e MFR).

Quando analisada a correlação das variáveis ligados à *M. javanica* (NG, Nema/g e FR), foi observada uma correlação de ordem negativa entre o número de galhas com os parâmetros vegetativos de estatura aos 15 DAI ($r=- 0,80^{**}$) e aos 30 DAI ($r=-0,67^*$), indicando uma possível interferência no desenvolvimento das cultivares de soja, haja vista que o número de galhas está diretamente ligado à capacidade de infecção de *M. javanica* nas raízes (Tabela 4). Na mesma direção, o número de nematoides por grama (Nema/g) teve uma correlação negativa, de ($r=-0,49^{ns}$) e ($r=-0,36^{ns}$), com os mesmos parâmetros (estatura 15 e 30 DAI). Além disso, foi verificada uma correlação alta com o número de galhas ($r= 0,83^{**}$), confirmando essa relação direta mencionada no resultado (Tabela 4). Similarmente aos dois parâmetros de nematoide relatados, o fator de reprodução (FR) teve uma correlação negativa com as mesmas variáveis de estatura de plantas aos 15 e 30 DAI ($r=-0,57^*$) e ($r=-0,44^{ns}$), e uma alta correlação com o número de galhas ($r= 0,90^{**}$) e o número de nematoides por grama de raiz ($r= 0,98^{**}$) (Tabela 4).

DISCUSSÃO

O controle de *M. javanica* na cultura da soja tem sido um grande desafio, principalmente porque essa espécie encontra-se amplamente disseminada nas regiões produtoras de soja e a maioria das cultivares comerciais utilizadas apresentam suscetibilidade a essa espécie de nematoide (Dias *et al.*, 2010; Schmitt e Belle, 2016). Nematoides desse gênero, por terem o hábito sedentário, desenvolveram mecanismos capazes de alterar as vias de sinalização iniciais de defesa nas plantas para estabelecer seu sítio de alimentação (Gheysen e Mitchum, 2011; Goverse e Smant, 2014; Ali *et al.*, 2018).

Este estudo mostrou que plantas de soja tratadas com *B. amyloliquefaciens* (0,20 L/ha⁻¹) e Piraclostrobina (0,20 L/ha⁻¹), através da pulverização foliar, reduziram numericamente o número de galhas, o número de nematoide por grama de raiz e o fator de reprodução de *M. javanica* em todas as cultivares estudadas. Resultados recentes obtidos por Soares e Dias-Arieira (2020) no estudo do patossistema *Meloidogyne graminicola* Golden e Birchfield (1965) / arroz constataram que plantas pulverizadas pelos elicitores acibenzolar-s-metil (ASM), um fertilizante à base de mananolossacarídeos (MOS) e silicato argila, logo após a inoculação, tiveram reduções significativas no fator de reprodução (FR) desse nematoide, bem como reduções numéricas na densidade populacional em comparação à testemunha.

Na mesma linha, Chaves *et al.*, (2016), utilizando o indutor Piraclostrobina em cana-de-açúcar no controle de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, verificaram uma resposta característica da ativação de mecanismos de resistência, devido ao aumento na atividade de enzimas antioxidantes, 5 dias após inoculação do nematoide. Toninato *et al.* (2019), estudando a aplicação foliar de fertilizantes em plantas de alface, verificaram reduções na população final de *M. javanica*. Da mesma forma, tais fertilizantes, quando associados a um produto com a presença de duas bactérias do gênero *Bacillus* sp.,

causaram reduções significativas no número de nematoides por grama de raiz, corroborando com os dados apresentados acima.

Os fatores que podem explicar a resposta de controle de *B. amyloliquefaciens* estão ligado aos seus múltiplos mecanismos de ação, que incluem produção de metabólitos tóxicos, competição por nutrientes na rizosfera, mudanças nos exsudatos radiculares liberados pela planta e a capacidade de induzir resistência da planta a patógenos (Kloepper *et al.*, 2004; Van Loon e Bakker, 2006; Govindasamy *et al.*, 2017), sendo neste caso do presente estudo, a possibilidade de ser indução de resistência, haja vista que, *B. amyloliquefaciens* foi aplicado via parte aérea das plantas. Já o possível efeito do indutor Piraclostrobina pode estar associado à sua capacidade de auxiliar na redução do estresse oxidativo por meio da atividade da enzima antioxidante peroxidase (Köhle *et al.*, 2002), ligada à indução de resistência (Zhan *et al.* 2018) e à proteção de plantas através da promoção da desintoxicação por peróxido de hidrogênio (Apel e Hirt, 2004).

Esses resultados indicam que ambos os indutores provavelmente foram capazes de induzir um estado de alerta nas cultivares, denominado por Sticher *et al.*, (1997) como estado de condicionamento ou sensibilização, no qual as plantas reagem mais rapidamente e com mais eficiência à infecção por patógenos. Ambos os mecanismos de indução (RSA e RSI) podem ser ativados por infecções de patógenos, por microorganismos benéficos ou substâncias químicas (Romeiro, 2007). As plantas sob o estado de indução produzem diversos compostos ligados à defesa, como fitoalexinas, glucosinolatos, compostos fenólicos, hormônios e proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (Bonaldo *et al.*, 2005; Mauch-Mani *et al.* 2017).

Curiosamente, apesar de os indutores terem reduzido numericamente o número de galhas, o número de nematoides por grama de raiz e, conseqüentemente, o fator de reprodução nas cultivares de soja, foi observado, em todas as cultivares tratadas com Piraclostrobina, um

decréscimo nos parâmetros vegetativos de estatura de plantas (15 e 30 DAI) e Massa fresca de parte aérea, respostas contrárias às observações de Kanungo e Joshi (2014). Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo realizado com cultivares de soja suscetíveis e resistentes inoculadas com *M. javanica*, no qual as duas cultivares apresentaram crescimento vegetativo reduzido quando tratadas com o elicitor acibenzolar-s-metil (ASM) (Puerari *et al.*, 2013). Esse fato pode estar ligado à hipótese de que a indução de resistência tem um alto custo de energia para a planta, haja vista que estudos com Piraclostrobina demonstraram mudanças nos hormônios relacionados ao estresse, desencadeando a ativação de enzimas antioxidantes ligadas à defesa da planta (Walters e Heil 2007; Chaves *et al.*, 2016). Efeito contrário foi observado com o elicitor *B. amyloliquefaciens* para os parâmetros supracitados. Tais respostas podem estar associadas à capacidade dessa rizobactéria de melhorar a biossíntese de hormônios vegetais como o ácido giberélico (GA3) e o ácido indol-3-acético (IAA), que possuem uma relação próxima com a disponibilidade de nutrientes das plantas (Niazi *et al.*, 2014; Shafi *et al.*, 2017).

Embora os indutores apresentem potencial para utilização no manejo de nematoides, seu efeito, por vezes, pode variar de acordo com a cultura e, conseqüentemente, a cultivar (Puerari *et al.*, 2013; Molinari, 2015). Essa variação foi observada nos resultados deste estudo, pois as cultivares SYN-Vtop RR e NA-5909 RG apresentaram fator de reprodução distintos e os maiores valores de controle sobre o tratamento com Piraclostrobina. Tal resposta não foi replicada para o indutor *B. amyloliquefaciens*, que obteve melhores resultados de controle nas cultivares BMX-Ativa RR e NA-5909 RG. Esse fato pode estar associado à resposta rápida do hospedeiro no processo de infecção, haja vista que *M. javanica* utiliza cofatores produzidos em suas glândulas esofagianas, capazes de minimizar ou suprimir as vias de sinalização iniciais de defesa nas plantas, para estabelecer seu sítio de alimentação (Gheysen e Mitchum, 2011; Bellafiore e Briggs, 2010; Goverse e Smant, 2014).

Frente a isso, o papel dos indutores no manejo dessa espécie de nematoides, em teoria, deve relacionar-se à cinética do estresse oxidativo, uma vez que as plantas produzem EROs para ativar suas respostas de defesa, criando um ambiente citotóxico ao nematoide e, conseqüentemente, estimulando a morte programada de células ou a resposta hipersensível (RH), detendo, assim, o nematoide invasor no local da infecção. Nessa linha de pensamento, é crucial que os elicitores mantenham as respostas iniciais de defesa mais sensíveis, dificultando a capacidade de supressão das vias de sinalização de defesa nas plantas pelo nematoide (Ali *et al.*, 2018).

Tendo em vista os aspectos observados e discutidos neste estudo, embora os indutores apresentem certa eficiência no controle de *M. javanica*, de certa forma eles podem interferir nos parâmetros vegetativos das plantas, como observado para ambos (Piraclostrobia e *B. amyloliquefaciens*), podendo ser essa interferência negativa ou positiva, com variação entre as cultivares, indo ao encontro a observações já relatadas por vários autores (Kloepper *et al.*, 2004; Puerari *et al.*, 2013; Soares e Dias-Arieira, 2020).

Apesar desse efeito sobre os parâmetros vegetativos, novos experimentos em condições de campo são necessários para avaliar o impacto desses indutores na produtividade da cultura da soja, visto que este estudo foi conduzido em condições controladas. Entende-se, portanto, que outros fatores, em condições de campo, podem minimizar ou potencializar tais efeitos, por isso pesquisas de campo são necessárias para confirmar se os produtos *B. amyloliquefaciens* e Piraclostrobina podem ser uma estratégia para compor o manejo integrado desse nematoide. Assim, este estudo ressalta a importância de investigar possíveis elicitores como agentes potenciais para o manejo de *M. javanica* na cultura da soja, entretanto, mais pesquisas são necessárias para entender melhor as vias metabólicas ativadas por ambos os elicitores, que resultaram na redução do fator de reprodução de *M. javanica* nas cultivares de soja.

CONCLUSÕES

A aplicação da rizobactéria *B. amyloliquefaciens* e do fungicida Piraclostrobina proporcionaram reduções significativas no fator de reprodução de *M. javanica* nas cultivares de soja, BMX-Ativa RR, SYN-Vtop RR e NA-5909 RG em relação à testemunha.

Apesar de as cultivares citadas apresentarem fatores de reprodução distintos o efeito dos produtos estudados parece ter sido capaz de ativar as respostas de defesa nessas cultivares, interferindo na reprodução de *M. javanica* em seus tecidos. Apesar desse estudo não ter contemplado análises bioquímicas de enzimas associadas à defesa das plantas, os resultados apresentados mostram evidências de que a utilização de indutores como estratégia de manejo para o controle de *M. javanica* apresentam potencial para o uso.

LITERATURA CITADA

- Agrios, J. N. 2005. Plant Pathology. New York: Academic Press. 887 p.
- Ali, M., M. Anjam, M. Nawaz, H. M. Lam e G. Chung. 2018. Signal transduction in plant-nematode interactions. International Journal of Molecular Science 19: 1648.
- Apel K. e H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.
- Araújo, F. F., R. J. Bragante e C. E. Bragante. 2012. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. Pesquisa Agropecuária Tropical 42 (2): 220-224.
- Barbosa, J. C. e W. Maldonado Júnior. 2015. Agroestat versão 1.0. Sistema de análises estatísticas de ensaios agronômicos. Universidade estadual paulista, campus de jaboticabal, SP, 396 p.
- Bellafiore, S e S. P. Briggs. 2010. Nematode effectors and plant responses to infection. Current Opinion in Plant Biology 13: 442-448.
- Bonaldo, S. M, S. F. Pascholati e S. R. Romeiro. 2005. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas in Cavalcanti, L. S., R. M. Di Piero, P. Cia, S. F. Pascholati, M. L. V. Resende e R. S. Romeiro. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, cap. 1, p. 11-28.
- Boneti, J. I. S. e S. Ferraz. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6 (3): 553.
- Carneiro, R. M. D. G. e M. R. A. Almeida. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira 25: 35-44.
- Chaves, A., E. M. R. Pedrosa, L. Willadino and M. S. O. Cardoso. 2016. Activation of resistance to *Meloidogyne incognita* in sugarcane treated with pyraclostrobin. Nematoda 3.
- Dias, W. P., A. Garcia, J. F. V. Silva, G. E. S. Carneiro. 2010. Nematoides em soja: identificação e controle. Circular Técnica 76: 1-8.
- Dias-Arieira, C. R., S. G. S. De Melo, H. Puerari e F. Lais. 2013. Induced resistance in the nematodes control. African Journal of Agricultural Research 8 (20): 2312-2318.
- Dong, L. Q. e K. Q. Zhang. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant Soil 288 (1): 31-45.
- Faria, C. M. D. R., S. M. L. Salgado, H. D. Campos, M. L. V. Resende, V. P. Campos e J. L. Coimbra. 2003. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematóide-planta. Revisão Anual de Patologia de Plantas 11: 373-410.
- Ferraz, B. C. C. L., G. L. Asmus, R. G. Carneiro, P. Mazaffera e J. F. V. Silva. 2001. Relação parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. 1. ed. Londrina: Embrapa Soja. 127 p.

- Ferraz, S., L. G. De Freitas, E. A. Lopez e C. R. Dias-Arieira. 2010. Manejo sustentável de fitonematoides. 1. ed. Viçosa: UFV. 306 p.
- Gheysen, G. e M. G. Mitchum. 2011. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 415-421.
- Goverse, A. e G. Smant. 2014. The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 243-265.
- Govindasamy, K, N. Sevugapperuma e A. Devi. 2017. A proteomic approach to identify *Bacillus subtilis* induced defense related proteins in noni challenged with *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 7: 109-116.
- Hunt, D. J. e Z. A. Handoo. 2009. Taxonomy, identification and principal species in Perry, R. N., N. Moens and J. L. Starr (Ed.). Root-knot nematodes. Cambridge, MA, USA: CABI North America Office, cap. 3, p. 55-97.
- Hussey, R.S. e K. R. Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028.
- Kanungo, M. e J. Joshi. 2014. Impact of opera (F-500) on crop plants: review. *Plant Sci. Today* 3, 174178.
- Kloepper, J. W., C. M. Ryu e S. Zhang. 2004, Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.
- Köhle, H., K. Grossmann, T. Jabs, M. Gerhard, W. Kaiser, J. Glaab e S. Herms. (2002). Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants in Dehne, H. W., U. Gisi, K. H. Juck, P. E. Russel and H. Lyr (Eds). *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*, Bonn, Germany: Agroconcept GmbH., 61-74.
- Mauch-Mani, B., I. Baccelli, E. Luna, V. Flors. 2017. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology* 68: 485-512.
- Molinari, S. 2016. Systemic acquired resistance activation in Solanaceous crops as a management strategy against root-knot nematodes. *Pest Management Science* 72: 888-896.
- Niazi, A., S. Manzoor, S. Asari, S. Bejai, J. Meijer e E. Bongcam-Rudloff. 2014. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113: a rhizobacterium that improves plant growth and stress management. *PLoS One* 9: e104651.
- Oliveira, M. D. M., C. M. R. Varanda e M. R. F. Félix. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters* 15: 152-158.
- Oostenbrink, M. 1966. Major characteristic of relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool, Wageningen* 66 (4): 1-46.
- Puerari H. H., C. R. Dias-Arieira, T. S. Dadazio, D. Mattei, T. R. B. Silva, R. C. F. Ribeiro. 2013. Evaluation of acibenzolar-S-methyl for the control of *Meloidogyne javanica* and effects on the development of susceptible and resistant soybean. *Trop Plant Pathol.* 38:44-48.

- Roese, A. D., R. D. L. Oliveira, F. F. Lanes. 2004. Reação de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) a *Meloidogyne paranaensis*. *Nematologia Brasileira* 28 (2): 131-135.
- Romeiro, R. S. 2007. Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos. 1. ed. Viçosa: UFV, p. 269.
- Schmitt, J. e C. Belle. 2016. Reação de cultivares de soja a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. *Nematropica*, 46 (1):76-80.
- Shafi, J., H. Tian e M. Ji. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnol. Biotechnol. Equ.* 31: 446-459.
- Soares, M., R., C. e C. R. Dias-Arieira. 2020. Induction of resistance to *Meloidogyne graminicola* in rice, *Canadian Journal of Plant Pathology*. DOI: 10.1080/07060661.2020.1778789.
- Sticher, L., B. Mauch-Mani, e J. P. Métraux. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270.
- Toninato, B. O., D. H. G. Souza, P. R. Pontalti, A. P. M. Lopes e C. R. Dias-Arieira. 2019. *Meloidogyne javanica* control in lettuce with fertilizers applied isolated or associated with biological product. *Horticultura Brasileira* 37: 271-276.
- Tihohod, D. 2000. *Nematologia agrícola aplicada*. 2. Ed. Jaboticabal: FUNEP. 473 p.
- Van Loon, L. C. e P. A. H. M. Bakker. 2006. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria in Siddiqui Z. A. (ed.) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p. 39-66. Dordrecht: Springer.
- Walters, D. e M. Heil. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol Mol Plant Path.* 71: 3-7.
- Zhan, L. P., D. L. Peng, X. Wang, L. A. Kong, H. Peng, S. M. Liu, Y. Liu e W. K. Huang. 2018. Priming effect of root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in rice. *BMC Plant Biol.* 18: 50.

Tabela 1. Tratamentos utilizados no estudo, princípios ativos e doses. Itaara - RS, 2018/19.

Tratamentos	Ingrediente ativo	Dose (L/ha ⁻¹)
Testemunha	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Integral®)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,2
Piraclostrobina (Comet®)	Piraclostrobina	0,2

Tabela 2. Estatura de plantas (cm) avaliadas aos 15 e 30 DAI; Massa Fresca e Seca de Parte Aérea (MFPA; MSPA) e Massa Fresca de Raiz (MFR) aos 60 DAI, tratadas com indutores de resistência uma hora após inoculação. Itaara - RS, 2018.

Cultivares	Estatura de Plantas 15 (DAI)		
	Testemunha	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Piraclostrobina
BMX-Ícone IPRO	21,8 Aa	22,5 Aa	20,2 Aa
BMX-Ativa RR	18,7 Ba	19,3 Ba	17,4 Ba
SYN-Vtop RR	17,3 Ba	17,4 Ba	14,7 Cb
NA-5909 RG	12,1 Ca	12,4 Ca	12,0 Da
CV (%)	11,74		
Cultivares	Estatura de Plantas 30 (DAI)		
	Testemunha	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Piraclostrobina
BMX-Ícone IPRO	34,0 Aa	36,2 Aa	30,2 Ab
BMX-Ativa RR	32,1 Aa	33,2 Ba	30,2 Ab
SYN-Vtop RR	28,2 Ba	29,2 Ca	26,2 Bb
NA-5909 RG	23,0 Ca	24,2 Da	21,0 Cb
CV (%)	6,38		
Cultivares	Massa Fresca de Parte Aérea (MFPA)		
	Testemunha	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Piraclostrobina
BMX-Ícone IPRO	64,2 Aa	60,9 Ba	57,3 Ba
BMX-Ativa RR	70,5 Aa	72,8 Aa	66,6 Aa
SYN-Vtop RR	66,1 Aa	69,3 Aa	63,6 Aa
NA-5909 RG	63,7 Aa	62,4 Ba	58,2 Ba
CV (%)	8,49		
Cultivares	Massa Seca de Parte Aérea (MSPA)		
	Testemunha	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Piraclostrobina
BMX-Ícone IPRO	12,8 Ba	13,9 Ba	12,5 Ba
BMX-Ativa RR	12,5 Ba	12,7 Ba	12,1 Ba

SYN-Vtop RR	14,4 Ab	16,2 Aa	14,5 Ab
NA-5909 RG	13,7 Aa	13,6 Ba	13,2 Ba
CV (%)	8,20		
	Massa Fresca de Raiz (MFR)		
Cultivares	Testemunha	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Piraclostrobina
BMX-Ícone IPRO	26,3 Aa	25,8 Aa	24,0 Aa
BMX-Ativa RR	23,2 Aa	23,7 Ba	22,7 Aa
SYN-Vtop RR	22,9 Aa	21,2 Ba	17,1 Bb
NA-5909 RG	22,8 Ab	29,0 Aa	24,2 Ab
CV (%)	15,64		

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula comparam cultivares dentro de cada tratamento e letras minúsculas comparam tratamento dentro de cada cultivar. Não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3. Número de Galhas (NG), Nematóide por Grama de Raiz (NGR) e Fator de Reprodução (FR) aos 60 DAI, tratados com indutores de resistência uma hora após a inoculação. Itaara - RS, 2018.

Cultivares	Número de galhas		
	Testemunha	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Piraclostrobina
BMX-Ícone IPRO	16 Ca	14 Ca	11 Ba
BMX-Ativa RR	45 Ba	42 Ba	41 Aa
SYN-Vtop RR	38 Ba	26 Ca	31 Aa
NA-5909 RG	88 Aa	70 Ab	48 Ac
CV (%)	27,76		
Cultivares	Nematóide/grama de raiz		
	Testemunha	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Piraclostrobina
BMX-Ícone IPRO	882 Da	710 Ca	703 Ca
BMX-Ativa RR	2539 Ba	1859 Ac	2179 Ab
SYN-Vtop RR	1506 Ca	1330 Ba	765 Cb
NA-5909 RG	3350 Aa	1645 Ab	1674 Bb
CV (%)	10,76		
Cultivares	Fator de reprodução (FR)		
	Testemunha	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Piraclostrobina
BMX-Ícone IPRO	4,33 Da	3,98 Ca	3,45 Ba
BMX-Ativa RR	11,47 Ba	8,82 Ab	9,54 Ab
SYN-Vtop RR	6,84 Ca	5,62 Bb	4,61 Bb
NA-5909 RG	15,28 Aa	9,31 Ab	8,38 Ab
CV (%)	12,97		

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula comparam cultivares dentro de cada tratamento e letras minúsculas comparam tratamento dentro de cada cultivar. Não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis Estatura de plantas (cm), avaliadas aos 15 e 30 DAI, Massa Fresca e Seca de Parte Aérea (MFPA; MSPA), Massa Fresca de Raiz (MFR), Número de Galhas (NG), Nematóide por Grama de Raiz (NGR) e Fator de Reprodução (FR) aos 60 DAI, tratadas com indutores de resistência uma hora após a inoculação. Itaara - RS, 2018.

VA/VA	EST. 15	EST. 30	MFPA	MSPA	MFR	NG	Nema/g	FR
EST. 15	1							
EST. 30	0,96**	1						
MFPA	0,18ns	0,36ns	1					
MSPA	-0,33ns	-0,27ns	0,42ns	1				
MFR	0,13ns	0,13ns	-0,24ns	-0,47ns	1			
NG	-0,80**	-0,67*	0,12ns	0,15ns	0,11ns	1		
NEMA/Grama	-0,49ns	-0,36ns	0,38ns	0,02ns	-0,00ns	0,83**	1	
FR	-0,57*	-0,44ns	0,31ns	0,00ns	0,06ns	0,90**	0,98**	1

Significância dos valores de F: ** = 1 %; * = 5 %; e NS = não significativo.

Artigo 2 (Foi submetido a revista Anais da Academia Brasileira de Ciências)

**3. ARTIGO 2 - ESTRESSE OXIDATIVO EM CULTIVARES DE SOJA EM
RESPOSTA AO PARASITISMO POR *Meloidogyne javanica***

Paulo Sergio dos Santos^{1*}, Ivan F. Dressler da Costa¹, Simone Gripa Minuzzi¹, Cristiano Bellé², Gracieli Rebelatto¹, Andrezza Lopez², Leonardo Furlani¹

¹ Centro de Ciência Rural, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima nº 1000, Camobi, RS, 97105-900, Brasil.

² Instituto Phytus, Itaara, 97105-900, Brasil.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, *Glycine max*, Nematoides-das-galhas.

Sessão dos AABC: Ciências Agrárias

*Autor para correspondência: Paulo Sergio dos Santos, e-mail: paulosbio@gmail.com

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo investigar a resposta de cultivares de soja com diferentes níveis de sensibilidade ao nematoide-das-galhas *Meloidogyne javanica* em curso temporal, analisando a interação inicial planta-nematoide por meio de enzimas antioxidantes como marcadores de estresse oxidativo. Foram desenvolvidos dois experimentos; o primeiro teve o objetivo de determinar, em horas, a resposta do complexo antioxidante em plantas de soja inoculadas com *M. javanica*, utilizando três densidades populacionais em cinco tempos e configurando um bifatorial 4 x 5 com 5 repetições. Os tratamentos foram (1) Sem inoculação de nematoides; (2) Inoculação de 50 (juvenis + ovos); (3) 5000 (juvenis + ovos); e (4) 10000 (juvenis + ovos), em cinco tempos de coleta; 1, 2, 6, 12 e 48 horas. A segunda etapa do estudo foi composta por um trifatorial 4 x 4 x 2 com 5 repetições, sendo quatro cultivares de soja, quatro intervalos de coleta - 6, 12, 24 e 48 horas - com e sem inoculação de *M. javanica*. Os parâmetros avaliados foram as enzimas antioxidantes peroxidase de fenóis (POX) e ascorbato peroxidase (APX), as concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Malondealdeídos (MDA) e o número de juvenis de *M. javanica* penetrados. No experimento 1, plantas de soja

na presença de *M. javanica* apresentaram aumento significativo na concentração de H₂O₂, variando em relação às densidades populacionais e tempos de coleta, promovendo a atividade das enzimas POX e APX. No experimento 2, a concentração de H₂O₂ variou entre as cultivares com e sem inoculação e nos diferentes tempos de coleta. Esses eventos foram evidenciados pela concentração de MDA e a atividade de POX e APX, indicando uma resposta rápida do hospedeiro quanto à infecção por *M. javanica*. O estresse oxidativo causado por *M. javanica* não variou entre cultivares de soja, independentemente do fator de reprodução, entretanto, POX e APX responderam de acordo com os menores fator de reprodução das cultivares.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, *Glycine max*, Nematoides das galhas.

1. Introdução

As interações patógeno/hospedeiro envolvendo organismos biotróficos são mediadas por interações específicas ligadas a genes de virulência dos patógenos e a genes de resistência das plantas. Nesse complexo (interação patógeno/hospedeiro), as plantas desenvolveram resistência como regra e suscetibilidade como exceção. Na teoria “gene a gene”, o reconhecimento do alelo patogênico de avirulência, pelo alelo específico do hospedeiro codificado pelo alelo de resistência R, resulta em uma interação incompatível, ou seja, resistência à doença. Em qualquer outra situação, a interação compatível ocorre, culminando na doença (Flor 1971).

Os fitonematoides são parasitas obrigatórios e se alimentam exclusivamente no citoplasma das células vegetais. Dentre as espécies existentes, os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) desenvolveram uma complexa relação com o hospedeiro, estabelecendo um sítio permanente de alimentação em células localizadas no cilindro central (Agrios 2005). Atualmente, existem diversas cultivares de soja resistentes ou moderadamente resistentes à *M.*

javanica, entretanto, os níveis de resistência são ainda limitados devido à restrita fonte de doadores (Dias et al. 2010).

No tocante a isso, a expressão fenotípica de resistência das plantas a nematoides geralmente é caracterizada pela Reação de Hipersensibilidade (RH), que consiste na morte programada de células no local da infecção, limitando, assim, seu desenvolvimento e reprodução (Williamson 1999). No nível bioquímico, essa complexa interação nematoide/planta é condicionada a um aumento significativo na concentração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) como Superóxido (O_2^-), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e Radical Hidroxila (OH^-), sendo a primeira resposta da planta ao ataque (Melillo et al. 2006).

Esse acúmulo de EROs nas células vegetais pode ser tóxico para ambos (planta e nematoide). No entanto, nas plantas, as EROs podem reagir como moléculas biológicas, ocasionando danos irreversíveis às membranas celulares, proteínas e ácidos nucléicos (Apel & Hirt 2004). Embora esse acúmulo de EROs possa inicialmente contribuir para a resistência aos nematoides (Kyndt et al. 2012), as plantas desenvolveram mecanismos não enzimáticos e enzimáticos (Apel & Hirt 2004) capazes de remover o excesso de EROs gerado durante a interação patógeno/hospedeiro. Tais mecanismos desempenham um papel fundamental na resistência a doenças de plantas.

Dentre essas enzimas destacam-se a Peroxidase de Fenóis (POX) e a Ascorbato Peroxidase (APX), que estão comumente envolvidas nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o estresse oxidativo e são bastante importantes na desintoxicação do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) na célula, prevenindo ou minimizando os danos oxidativos (Mittler 2002; Sharma et al. 2012). A enzima POX está diretamente relacionada à oxidação de compostos fenólicos, à ligação de polissacarídeos, à oxidação do ácido indol-3-acético, a ligações monoméricas, à lignificação, à cicatrização de feridas e à proteção contra patógenos (Resende et al. 2003). A APX é uma hemoproteína e, nesse processo de desintoxicação do H_2O_2 , exige

o ácido ascórbico como redutor. Essa enzima apresenta uma alta afinidade com H_2O_2 , o que possibilita eliminá-lo mesmo em baixas concentrações (Sharma et al. 2012). Essas PODs em conjunto representam componentes importantes do sistema de proteção oxidativa e sua atividade pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse resultante de fatores bióticos (Apel & Hirt 2004; Barbosa et al. 2014).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a resposta de cultivares de soja com diferentes níveis de fator de reprodução ao nematoide-das-galhas *Meloidogyne javanica* em curso temporal, analisando a interação inicial planta/nematoide e utilizando enzimas antioxidantes como marcadores de estresse oxidativo.

2. Materiais e Métodos

Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação no município de Itaara, Rio Grande do Sul, localizado em latitude 29°35'8"S, longitude 53°48'28"O e altitude de 444m, na safra 2018-2019. As temperaturas máximas e mínimas registradas dentro da casa de vegetação foram 28°C e 19°C, respectivamente.

2.1 Ensaio 1 - Densidade populacional *versus* respostas bioquímicas

O ensaio 1 foi realizado com o objetivo de entender qual densidade populacional de *M. javanica* traz a melhor resposta e em qual tempo frente aos parâmetros bioquímicos. A cultivar utilizada foi BMX-Ativa RR, por apresentar suscetibilidade à *M. javanica*. A semeadura ocorreu de forma direta, em vasos com capacidade de 700 mL, preenchidos com substrato composto por areia e solo, na proporção de 1:1 previamente esterilizado. Para cada vaso, foram semeadas três sementes de soja sem tratamento químico e, após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste, deixando uma plântula por unidade experimental.

O estudo foi composto por um bifatorial 4 x 5 com 5 repetições, sendo eles quatro densidades populacionais: (1) - uma testemunha sem inoculação de nematoides, (2) - 50 nematoides inoculados (3) - 5000 nematoides inoculados (4) - 10000 nematoides inoculados; e 5 tempos de coleta: 1, 2, 6, 12 e 48 horas após a inoculação dos nematoides.

2.2.1 Inoculação de *Meloidogyne javanica*

O inóculo de *M. javanica* foi proveniente de raízes de plantas de soja infectadas do município de Júlio de Castilhos, RS. Após a confirmação da espécie por meio do padrão perineal de 10 fêmeas e a caracterização bioquímica através do fenótipo de esterase (Carneiro & Almeida, 2001), em mesma quantidade de fêmeas, massas de ovos foram coletadas e inoculadas em plantas de tomateiro cultivar híbrido Apolo F 1 visando à multiplicação do nematoide. Após 120 dias, as plantas de tomateiro foram coletadas e o inóculo foi preparado de acordo com as técnicas de extração de Hussey & Barker (1973), modificadas por Boneti & Ferraz (1981).

A inoculação dos tratamentos foi realizada no estágio fenológico V/2, por meio da abertura de três orifícios no solo, em distância de 2 centímetros do colo das plantas e com 2 centímetros de profundidade. No estudo preliminar, o volume correspondente às três diferentes densidades populacionais estudadas (50, 5000 e 10000 (juvenis + ovos) foi dividido e inoculado em cada orifício.

2.1.2 Análises Bioquímicas

Para a determinação da atividade do complexo antioxidante, foram coletadas cinco plantas de cada tratamento, sendo as raízes cuidadosamente lavadas e, em seguida, mantidas em nitrogênio líquido durante a amostragem. Após, as mesmas foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até as análises bioquímicas.

2.1.2.1 Determinação da Atividade da Enzima Peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

De acordo com Kar & Mishra (1976), a atividade da enzima POX foi determinada pelo método de oxidação do piragolol. Para a análise, foram utilizados 0,5g de tecido radicular, moído em pó fino com o auxílio de almofariz e pistilo, aos quais foi adicionado nitrogênio líquido durante esse processo. Após a moagem, o pó fino foi homogeneizado em 2000 μl de uma solução contendo 50 mM de um tampão de fosfato de potássio (pH 6,8). Em sequência a solução foi centrifugada a 12.000 $\times g$ por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado como um extrato enzimático bruto. A reação foi iniciada após 50 μL do extrato enzimático bruto a 950 μL da mistura de reação com tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), 20 mM piragolol e 20 mM H_2O_2 . A determinação da atividade da peroxidase foi baseada na absorvância de purpurogalina colorida em espectrofotômetro a 420 nm por 1 min a 25°C. Um coeficiente de extinção de 2,47 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Chance & Maehley 1955) foi utilizado para calcular a atividade da enzima POX, que foi expressa em micro mol de purpurogalina produzida por minuto, por miligrama de proteína.

2.1.2.2 Determinação da Atividade da Enzima Ascorbato Peroxidase (APX, EC: 1.11.1.1)

De acordo com Nakano & Asada (1981), a atividade da enzima APX foi determinada pela taxa de oxidação do ascorbato. Para a realização dessa análise, foi utilizada parte do extrato enzimático bruto obtido na análise anterior da POX. A reação foi iniciada utilizando 50 μL do extrato enzimático bruto em 950 μL da mistura de reação com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), 0,8 mM ascorbato e 1 mM H_2O_2 . A determinação da atividade da ascorbato peroxidase é mensurada via taxa de oxidação da ascorbato em espectrofotômetro a 290 nm por 1 min a 25°C. Um coeficiente de extinção de 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ é usado para calcular

a atividade da ascorbato peroxidase (Fortunato et al. 2015) e o valor é corrigido pelo conteúdo de proteína (Bradford 1976).

2.1.2.3 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Para determinação, foi utilizado 0,1 g de tecido radicular moído em pó fino. O pó fino foi homogeneizado em um volume de 1500 µl de TCA 0,1%. Essa solução foi centrifugada a 12.000 × g por 15 min a 4°C (Loreto & Velikova 2001). Após isso, 500 µl do sobrenadante foram adicionados a uma mistura de reação contendo 500 µl de solução tampão de fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1000 µl de iodeto de potássio (1M). A absorbância das amostras foi determinada a 390 nm. A concentração de H₂O₂ nas amostras foi estimada com base em uma curva padrão de H₂O₂ e expressa em mili mol por grama de peso fresco.

2.1.2.4 Concentração de Malondialdeído (MDA)

O dano oxidativo nas células radiculares foi estimado como a concentração de substâncias reativas totais ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso como equivalente ao malondialdeído (MDA), de acordo com Cakmak & Horst (1991). Para isso, 0,1g de tecido radicular foi macerado, com auxílio de um almofariz e um pistilo com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino, o qual foi homogeneizado em 2000 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (wt vol⁻¹) em banho de gelo. Essa solução foi centrifugada a 12.000 x g por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, 500 µl do sobrenadante foi adicionado a 1500 µl de solução TBA/TCA (0,5% de TBA em 20% de TCA) e incubado em banho-maria a 95°C por 30 min. Após esse período, a reação foi parada em banho de gelo. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 9000 x g por 10 min e a absorbância específica foi determinada a 532 nm. A absorbância não específica foi estimada a 600 nm e subtraída do valor da absorbância específica. Um coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath & Packer 1968) foi usado

para calcular a concentração de MDA, que foi expressa em micro mol por quilogramas de peso fresco.

2.1.3 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa Sisvar (Ferreira 2011).

3. Ensaio 2 – Respostas bioquímicas de cultivares

O ensaio 2 foi realizado com o objetivo de investigar em curso temporal o estresse oxidativo em cultivares de soja em reposta ao parasitismo de *M. javanica*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e a semeadura ocorreu de forma direta, conforme mencionado no ensaio 1. O estudo foi composto por um delineamento inteiramente casualizado em esquema trifatorial 4 x 4 x 2 com 5 repetições, sendo quatro cultivares de soja (BMX-Ativa RR, NA-5909 RG, SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO), quatro intervalos de coleta (6, 12, 24 e 48 horas após inoculação), com e sem inoculação de nematoides. As cultivares foram escolhidas por apresentarem fatores de multiplicação (FR) variados, sendo duas cultivares com $FR > 10$ (BMX-Ativa RR e NA 5909 RG) e duas com $FR < 7$ (SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO). Neste ensaio, a inoculação de *M. javanica* ficou estabelecida em 2500 juvenis/planta, com base nos resultados do ensaio 1, sendo realizada conforme descrito no mesmo. As análises bioquímicas de POX, APX, H_2O_2 e MDA foram realizadas conforme descrito anteriormente.

3.1 Inoculação de *Meloidogyne javanica*

O inoculo utilizado foi o mesmo do ensaio 1, sendo ele preparado de acordo com as técnicas de extração de Hussey & Barker (1973), modificadas por Boneti & Ferraz (1981), e parte da suspensão contendo ovos e juvenis, submetidos ao método de extração de funil de Baermann modificado (Christie & Perry, 1951), sendo incubadas em câmara de eclosão a 26 °C por 72 horas, para estímulo da eclosão dos ovos e obtenção dos juvenis de segundo estadio, no intuito de melhor uniformizar o inóculo, diferentemente do primeiro experimento, no qual o inóculo foi composto por juvenis + ovos. Esse ajuste metodológico foi necessário em razão da sabida variação no tempo de eclosão dos ovos de *M. javanica* e o curto período de tempo experimental. Sendo assim, foi inoculada uma população de 2.500 juvenis (J₂) por planta, com base nos resultados obtidos no estudo anterior, no qual as populações compostas por 50 e 5000 J₂+ovos representaram as respostas mais consistentes quanto à atividade do complexo oxidante. Por conta disso, utilizou-se uma população intermediária.

3.2 Análise de nematoide penetrados

A análise de nematoides foi realizada nas raízes das plantas, nos mesmos períodos de coleta para análise enzimática (6, 12, 24 e 48 horas). Em cada período de coleta, cinco vasos foram encaminhados ao laboratório, onde as plantas de soja foram lavadas, para retirada do solo aderido às raízes e, em seguida, foram seccionadas na região do colo, de modo a separar a parte aérea do sistema radicular. Feito isso, as raízes das plantas de soja de cada repetição foram submetidas à técnica de coloração de raiz descrita por Byrd et al (1983). Após essa etapa de coloração, as raízes foram dispostas em lâminas de vidro sob microscópio para contagem do número de juvenis de *M. javanica* penetrados em seus respectivos períodos após inoculação nas diferentes cultivares. A avaliação do índice de penetrados consistiu em um bifatorial 4 x 4, sendo quatro cultivares e 4 tempos de coleta, com 5 repetições.

3.3 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa Sisvar (Ferreira 2011).

4. Resultados

Analisando o resultado do experimento 1 (Tabela I), houve alterações significativas das enzimas peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), e as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) já nas primeiras duas horas após a inoculação, indicando uma resposta rápida do hospedeiro pela à infecção por *M. javanica*. Esses resultados auxiliaram no direcionamento e estruturação do segundo ensaio, visando a compreender quando as plantas de soja respondem ao estresse provocado por *M. javanica* na cultura da soja, realizado mediante a utilização de enzimas antioxidantes como marcadores de estresse.

No experimento 2, houve diferença significativa na atividade das enzimas POX e APX, variando entre as diferentes cultivares de soja, tempos de coleta (6, 12, 24 e 48 horas após inoculação - HAI), com e sem inóculo de *M. javanica* (Tabela II). As concentrações de H_2O_2 e MDA apresentaram variações similares, sendo que, para H_2O_2 , houve diferença estatística nos tempos de coleta de 12 e 48 HAI, nos tempos de coleta *versus* cultivares, bem como nos tratamentos sem e com inóculo dentro de cada cultivar e tempo de coleta (Tabela II). Já para MDA, foram observados valores significativos nas diferentes cultivares de soja, nos tempos de coleta de 6, 24 e 48 HAI e em tratamentos sem e com inóculo dentro de cada cultivar e tempo de coleta (Tabela II). Para a enzima POX e as concentrações de H_2O_2 e MDA

foi observada interação entre os fatores cultivar, tempo de coleta, com e sem inoculação de *M. javanica*.

Para a variável de número de nematoides penetrados, houve interação significativa entre os fatores cultivares e tempos de coleta, sendo observada diferença significativa na penetração de juvenis de *M. javanica* nas raízes das cultivares de soja nos respectivos tempos de coleta (Figura 1).

Analisando a atividade de POX a seis horas, foram observados valores significativos nas cultivares SYN-Vtop RR (119,7%) e BMX-Ícone IPRO (31,4%) em relação às mesmas não inoculadas (Tabela II). Esse fato pode estar relacionado à sensibilidade dessas cultivares de soja, visto que, nesse tempo de coleta, o número médio de juvenis de *M. javanica* penetrados nas raízes dessas cultivares variou na ordem de 3,75 a 4,0, respectivamente (Figura 1). Já a atividade da enzima APX apresentou maior variação entre as cultivares com e sem inóculo, entretanto, foi observada uma tendência similar no aumento da atividade dessa enzima com valores que variaram de 3,3% a 40,7%, respectivamente (Tabela II).

Esses resultados verificados para POX e APX tiveram relação direta na concentração de H₂O₂, sendo observados valores entre 10,9% a 38,9% de aumento em relação às cultivares não inoculadas, com significância para as cultivares BMX-Ativa RR, NA-5909 RG e SYN-Vtop RR (Tabela II). Nessa mesma direção, a concentração de MDA teve um aumento de H₂O₂, com os respectivos valores - 25,4%, 81,2% e 18,2% - para as cultivares supracitadas, indicando um possível estresse no tempo de 6 horas (Tabela II).

Na avaliação de 12 horas, a atividade de POX apresentou, em todas as cultivares, valores de porcentagem superiores em relação às cultivares não inoculadas, com valores que variaram de 20,8% a 80,3%, sendo significativos para as cultivares NA-5909 RG, SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO (Tabela II). Essa resposta de POX está diretamente ligada à elevada concentração de H₂O₂ nas cultivares de soja, pois foram observados valores entre 14,3% e

55,9%, respectivamente (Tabela II). Analisando o número médio de juvenis de *M. javanica* penetrados nas raízes das cultivares citadas, foram observadas as respectivas taxas de infecção: 8,25, 9,50 e 11,25 indivíduos, entretanto, não houve diferença significativa (Figura 1).

No tempo de coleta às 24 horas, comparadas as cultivares com e sem inoculação de *M. javanica*, verificou-se um aumento da atividade de POX em todas as cultivares inoculadas, sendo significativos, porém, apenas nas cultivares de soja NA-5909 RG (34,4%) e SYN-Vtop RR (75,1%) (Tabela II). Em relação à atividade da APX, comparando as cultivares, houve diferença significativa, sendo as cultivares SYN-Vtop RR (17,5%) e BMX-Ícone IPRO (14,8%) as que apresentaram maior porcentagem de atividade em relação às não inoculadas (Tabela II). Esses resultados (POX e APX) estão diretamente ligados à concentração de H₂O₂, que em todas as cultivares inoculadas *versus* as não inoculadas apresentou aumento significativo com valor médio na ordem de 25,9% (Tabela II). Já a concentração de MDA variou significativamente nas cultivares NA-5909 RG (20,1%) e BMX-Ícone IPRO (53,1%). Comparando esses resultados da atividade de POX e APX e as concentrações de H₂O₂ e MDA com o número médio de juvenis de *M. javanica* penetrados nas raízes das cultivares, verificou-se valores entre 7,50 e 11,75 indivíduos, entretanto não houve diferença significativa em relação às cultivares (Figura 1).

Na avaliação de coleta às 48 horas, os maiores valores de atividade enzimática de POX foram observados nas cultivares SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO, diferindo estatisticamente das demais. No entanto, no tocante às cultivares com e sem inoculação de *M. javanica*, foi observado um aumento da atividade de POX em todas as cultivares com inoculação em comparação às sem inoculação, sendo esse aumento significativo nas cultivares NA-5909 RG (50,9%), SYN-Vtop RR (43,9%) e BMX-Ícone IPRO (35,0%) (Tabela II). Para a enzima APX, houve variação significativa nas cultivares SYN-Vtop RR

(26,8%) e BMX-Ícone IPRO (54,1%) em comparação às sem inoculação (Tabela II). O comportamento das enzimas POX e APX pode ser explicado por meio da concentração de H_2O_2 , que apresentou acréscimos significativos em todas as cultivares com inoculação, sendo verificados nas cultivares; BMX-Ativa RR (23,1%), NA-5909 RG (50,4%), SYN-Vtop RR (25,8%) e BMX-Ícone IPRO (32,3%) (Tabela II). Essa concentração de H_2O_2 também teve relação direta com o acúmulo de MDA, sendo observado nas cultivares NA-5909 RG (40,4%) e BMX-Ícone IPRO (71,2%), que apresentaram os maiores valores de H_2O_2 e o maior acúmulo de MDA, indicando um possível estresse. Cruzando esses resultados com o número de juvenis de *M. javanica* penetrados nas raízes, houve diferença significativa em relação às cultivares, sendo observados os respectivos valores de penetrados: 37,25 (BMX-Ativa RR), 31,25 (NA-5909 RG), 61,25 (SYN-Vtop RR) e 15,25 (BMX-Ícone IPRO) (Figura 1).

Aplicando um teste de correlação entre as variáveis Fator de reprodução (FR) – vide coeficientes da Tabela 4, Artigo 1 – Peroxidase de fenóis (POX), Ascorbato peroxidase (APX), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Malondialdeídos (MDA), Número de juvenis penetrados às 6 horas (NP 6 horas), Número de juvenis penetrados às 12 horas (NP 12 horas), Número de juvenis penetrados às 24 horas (NP 12 horas) e Número de juvenis penetrados às 48 horas (NP 48 horas), notou-se que houve correlação negativa entre o fator de reprodução das cultivares de soja em relação às enzimas antioxidantes POX ($r=-0,96^*$) e APX ($r=-0,73^{ns}$), mostrando que quanto mais sensível a cultivar de soja, menor é a ativação dessas enzimas (Tabela III).

Na mesma direção, a concentração de H_2O_2 teve uma correlação de mesma ordem para as enzimas POX ($r=-0,61^{ns}$) e APX ($r=-0,36^{ns}$). Entretanto, a correlação de MDA não foi expressiva para ambas as enzimas (POX e APX), somente para H_2O_2 ($r=-0,90^{ns}$) (Tabela III). Quando observados os tempos de coleta, constatou-se que às 6 horas houve uma correlação elevada com POX ($r=-0,62^{ns}$) e H_2O_2 ($r=-0,71^{ns}$), mantendo esse padrão nos tempos

subsequentes, porém, somente para H₂O₂ com leve redução nos tempos subsequentes ($r=-0,65^{ns}$), ($r=-0,66^{ns}$), ($r=-0,54^{ns}$), respectivamente (Tabela III).

5. Discussão

A infecção causada por *M. javanica* aumentou a produção de H₂O₂ em todas as cultivares de soja e tempos de coleta em comparação às plantas não inoculadas, tendo início já às 6 horas. Apesar de trabalhar-se com diferentes cultivares em específico, com diferentes fatores de reprodução, a concentração de H₂O₂ foi elevada em todos os tempos de coleta, independente da cultivar. Esperava-se uma resposta associada ao fator de reprodução das cultivares, quanto menor fosse o FR, mais rápido seria a atividade das enzimas antioxidantes POX e APX, que desempenham um papel importante no mecanismo de defesa do hospedeiro, pois promovem desintoxicação de (H₂O₂). Tal resposta foi observada nos resultados mostrados acima.

Ao infectar as raízes das plantas, os juvenis de *M. javanica* provocam poucos danos em comparação a outras espécies, uma vez que migram entre as células. Apesar disso, a produção de espécies reativas de oxigênio como H₂O₂ pode ocorrer já na fase inicial da penetração na raiz (Gheysen & Mitchum 2011). Esse acúmulo nas células vegetais pode ser tóxico para ambos, planta e nematoide (Gillet et al. 2017; Sato et al. 2019). No entanto, de acordo com Apel & Hirt (2004) essa é uma das reações de defesa mais rápidas ao ataque de patógenos, conhecida como explosão oxidativa, medida principalmente pelo acúmulo de H₂O₂ no local da tentativa de invasão.

No tocante a isso, a reação inicial de uma cultivar suscetível é semelhante à de uma cultivar resistente e pode ser o resultado de secreções de nematoides nos tecidos das plantas durante sua migração (Davis et al. 2000; Silva, J. 2001). Melillo et al. (2006), estudando a produção EROs e H₂O₂ durante as etapas iniciais da interação planta/nematoide, ao comparar

as respostas de plantas de tomate suscetíveis e resistentes a populações de *M. incognita* avirulentas e virulentas, verificou um aumento mais significativo nos níveis de EROs em raízes das cultivares resistentes.

Foram observadas diferentes respostas entre as cultivares quanto aos parâmetros bioquímicos, principalmente quando comparadas às testemunhas sem inoculação. Nas plantas inoculadas, a concentração de H_2O_2 aumentou em todas as cultivares de soja em resposta à infecção de *M. javanica*, independentemente do FR. Essa concentração H_2O_2 é gerada por uma reação catalisada por Superóxido Dismutase (SOD) ou mesmo produzida como um produto normal do metabolismo celular da planta (Sharma et al. 2012). Segundo Melillo et al. (2011), a explosão oxidativa em plantas ocorre nos estágios mais iniciais de infecção do nematoide parasita de plantas, corroborando com os nossos resultados. Embora a interação às 6 HAI dos juvenis de *M. javanica* nas raízes tenha sido igualmente baixa, mesmo inoculando somente juvenis infectivos (J_2), esse aumento de juvenis penetrados ocorreu nos tempos subsequentes (12, 24 e 48 HAI) (Figura 1).

A enzima POX está diretamente envolvida na remoção de H_2O_2 e também desempenha um papel importante na defesa das plantas contra patógenos, pois participa diretamente da biossíntese de lignina e cicatrização de feridas (Resende et al. 2003). O aumento da atividade dessa enzima é necessário para diminuir as concentrações de H_2O_2 (Apel & Hirt 2004). Os resultados mostraram um aumento significativo da atividade de POX nas cultivares com baixo fator de reprodução (SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO) já nos primeiros tempos de coleta, indicando uma resposta mais rápida dessas cultivares à infecção (Tabela II). A enzima APX apresentou significância para as mesmas cultivares apenas no tempo de 48 HAI, apesar de que, numericamente, sua atividade tenha sido superior ao observado na testemunha em todas as avaliações. Diante disso, concluiu-se que a APX possui uma resposta mais demorada nessa interação, mesmo apresentando maior afinidade na

remoção de H₂O₂ (Apel & Hirt 2004), situação contrária aos resultados apresentados na Tabela II.

A concentração de MDA tem uma relação direta com o aumento de H₂O₂ (Kruse et al. 2006; Sharma et al. 2012). Isso fica comprovado, em parte, com os resultados obtidos neste estudo, visto que foram observadas altas concentrações de MDA no primeiro tempo de coleta nas duas cultivares, BMX-Ativa RR e NA-5909 RG, com maior FR. Os nematoides parasitas de plantas são parasitas de ordem obrigatória, sendo totalmente dependentes de seu hospedeiro para suprir sua demanda por nutrientes (Mitchum et al. 2007; Hofmann et al. 2010). A resistência à *M. javanica*, em sua grande maioria, está baseada na RH, desencadeada pela morte programada de células no local da infecção (Williamson 1999). De acordo com Ali et al. (2018), as plantas produzem EROs para ativar suas respostas de defesa contra os patógenos, estimulando a morte programada de células ou a resposta hipersensível para deter e matar o patógeno invasor no local da infecção.

Das et al. (2010), em estudo de perfil transcricional de sítios de alimentação de nematoide-das-galhas em raízes de feijão-caupi, inferem que esses microrganismos podem aliviar ou neutralizar a liberação de EROs na célula hospedeira para evitar a morte celular. Isso ocorre através da manipulação das enzimas antioxidantes da planta, pois as mesmas produzem mais EROs ao mesmo tempo em que diminui sua capacidade de eliminação para que ocorra o acúmulo de EROs, causando a morte celular. Nessa proposta, os nematoides das galhas podem modular a produção de EROs, não como compostos tóxicos, mas como moléculas sinalizadoras para a ativação das vias antioxidantes (Gillet et al. 2017; Ali et al. 2018).

Entretanto, considerando que esse grupo de patógenos é capaz de secretar moléculas efetoras com o potencial de controlar as vias de sinalização celular e, assim, estabelecer relações de longo tempo com o hospedeiro (Kyndt et al. 2013; Mantelin et al. 2015), pode-se

explicar por que as enzimas antioxidantes POX e APX apresentaram correlação baixa e inversamente proporcional ao acúmulo de H_2O_2 , sendo a enzima POX a com maior atividade nos tempos de coleta nas cultivares com baixo FR, independentemente de a APX apresentar uma maior afinidade com H_2O_2 que a POX (Apel & Hirt 2004). Estudos nessa mesma linha, utilizando análises de transcriptoma, relataram que nematoides parasitos de plantas interferem nas espécies reativas de oxigênio, no apoplasto, através da liberação de captadores de EROs como glutathione peroxidase (GPx), peroxidase (PER), peroxirredoxina (PRXs) e catalases (CTLs) (Bellafiore & Briggs 2010).

Nos resultados mostrados acima, as concentrações H_2O_2 foram mais evidentes em todas as cultivares inoculadas em relação às testemunhas; porém, o comportamento de MDA não teve uma correlação direta com esse aumento, podendo não ser suficiente para ocasionar danos às membranas celulares através da peroxidação lipídica. Os produtos da peroxidação lipídica da membrana, como o MDA, podem ser um importante indicador para estimar a extensão do dano celular causado por estresse oxidativo induzido por patógenos (Silva, L. et al. 2020), fato não observado neste estudo; entretanto, curiosamente, isso pode estar ligado à capacidade desse nematoide de alterar as vias de sinalização iniciais de defesa nas plantas para estabelecer seu sítio de alimentação (Goverse & Smant 2014).

Em geral, esses resultados indicaram que a interação *Meloidogyne javanica* e cultivares de soja resultou na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial H_2O_2 , não apresentando grandes diferenças quanto ao acúmulo de H_2O_2 em escala temporal (horas), sendo relativamente discretas as diferenças em comparação ao fator de reprodução das mesmas, o que evidencia uma resposta similar independente do FR. No entanto, as enzimas antioxidantes POX e APX tiveram uma correlação particularmente mais evidente nas cultivares com FR menor (SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO), indicando uma possível resposta mais rápida do complexo antioxidante, haja vista que ambas as enzimas fazem parte

de uma rede de mecanismos ligados à defesa do hospedeiro contra o estresse oxidativo na célula, prevenindo ou minimizando os danos.

Apesar de existirem na literatura diversos estudos contemplando a cinética do estresse oxidativo associada à interação com patógenos biotróficos, ainda são escassos os estudos que contemplem o patossistema *M. javanica* versus soja, sendo este trabalho um dos primeiros a gerar informações relacionadas ao comportamento de diferentes cultivares de soja a esse importante parasita. Por fim, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as enzimas antioxidantes podem servir como marcadores de estresse oxidativo, estando ligadas ao fator de reprodução das cultivares; contudo, novos estudos deverão ser conduzidos com mais cultivares de soja para confirmar tais resultados.

6. Conclusões

Foi verificado que a infecção de *M. javanica* nas raízes das cultivares de soja aumentou a produção de H₂O₂ em todas as cultivares, independentemente do FR e do tempo de coleta. Já as enzimas antioxidantes POX e APX tiveram uma correlação mais estreita com as cultivares com menor FR (SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO), indicando uma possível resposta mais rápida do complexo antioxidante, haja vista que ambas fazem parte de uma rede de sinalização ligada a mecanismos de defesa do hospedeiro. Pesquisas adicionais deverão ser conduzidas com mais cultivares de soja para confirmar tais resultados obtidos neste trabalho.

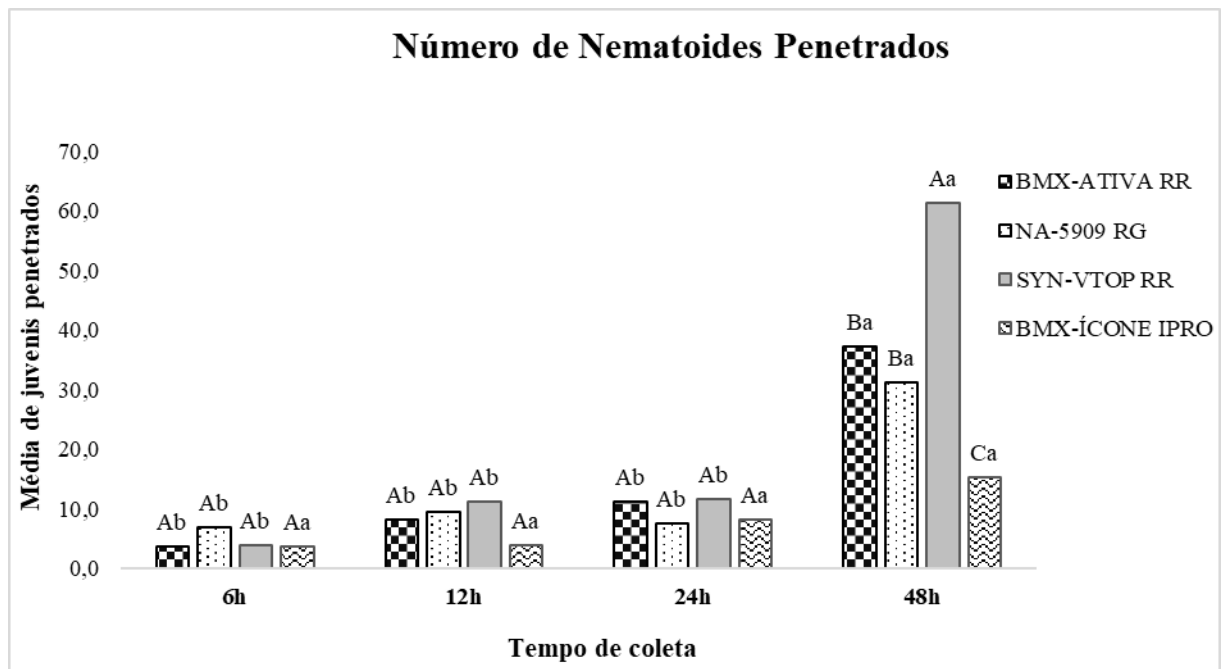
7. Referências

- AGRIOS JN. 2005. Plant Pathology. New York: Academic Press.
- ALI M, ANJAM M, NAWAZ M, LAM HM, CHUNG G. 2018. Signal transduction in plant-nematode interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 19:1648.
- APEL K, HIRT H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- BAERMANN G. 1917. Eine einfache method zur auffindung von ankvlostomum Nematoden) larven in erdproben. *Ned. Indie*, 57: 131-137.
- BARBOSA MR, SILVA MMA, WILLADINO L, ULISSES C, CAMARA T. 2014. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, 44: 453-460.
- BELLAFFIORE S, BRIGGS SP. 2010. Nematode effectors and plant responses to infection. **Current Opinion in Plant Biology** 13: 442–448.
- BONETI JIS & FERRAZ S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6: 553.
- BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254.
- BYRD Jr. DW, KIRKPATRICK J, BAEKER KR. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *J Nematol.* 15:142-143.
- CARNEIRO RMDG; ALMEIDA MRA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25: 35-44.
- CHANCE B & MAEHLEY AC. 1955. Assay of catalases and peroxidases. **Methods Enzymol.** 2:764-775.
- CHRISTE JR & PERRY VG. 1951. Removing nematodes from soil. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 18 (2), 106-108.
- DAS S, EHLERS JD, CLOSE TJ, ROBERTS PA. 2010. Transcriptional profiling of root-knot nematode induced feeding sites in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using a soybean genome array. *BMC Genomics* 11: 480.
- DAVIS EL, HUSSEY RS, BAUM TJ, BAKKER J, SCHOTS A, ROSSO MN, ABAD P. 2000. *Nematode parasitism genes. Annual Review of Phytopathology* 38: 365–396.
- DIAS WP, GARCIA A, SILVA JFV, CARNEIRO GES. 2010. Nematoides em soja: identificação e controle. **Circular Técnica**, 76:1-8.

- FERREIRA DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência Agrotecnologia*. 35:1039–1042.
- FLOR HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275–296.
- FORTUNATO AA, DEBONA D, BERNARDELI AMA, RODRIGUES FA. 2015. Changes in the antioxidant system in soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola*. *Biochemistry and Cell Biology*, 105: 1050-1058.
- GHEYSEN G, MITCHUM MG. (2011) How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 415–421.
- GILLET FX, BOURNAUD C, JUNIOR JDAS, GROSSI-DE-SA MF. 2017. Plant-parasitic nematodes: towards understanding molecular players in stress responses. *Ann Bot.* 119: 775–789.
- GOVERSE A, SMANT G. 2014. The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 243–265.
- HEATH RL & PACKER L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:189-198.
- HOFMANN J, EL ASHRY A, ANWAR S, ERBAN A, KOPKA J, GRUNDLER F. 2010. Metabolic profiling reveals local and systemic responses of host plants to nematode parasitism. *Plant J* 62:1058–1071.
- HUSSEY RS & BARKER KR. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- KAR M, & MISHRA D .1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.
- KRUSE ND, VIDAL RA, DALMAZ C; TREZZI MM, SIQUEIRA I. 2006. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica Sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. *Planta Daninha*, 24:379-390.
- KYNDT T, DENIL S, HAEGEMAN A, TROOSKENS G, BAUTERS L. 2012. Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. *New Phytol.* 196:887–900.
- KYNDT T, VIEIRA P, GHEYSEN G, DE ALMEIDA-ENGLER J. 2013. Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta* 238: 807–818.
- LORETO F & VELIKOVA V .2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127: 1781-1787.
- MANTELIN S, THORPE P, JONES JT. 2015. Suppression of plant defences by plantparasitic nematodes. In: Carolina E, Carmen F, eds. *Advances in botanical research*. San Diego: Academic Press, 325–337.

- MELILLO MT, LEONETTI P, BONGIOVANNI M, CASTAGNONE-SERENO P, BLEVE-ZACHEO T. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato root-knot nematode interactions. *New Phytol.* 170:501–12.
- MELILLO MT, LEONETTI P, LEONE A, VERONICO P, BLEVE-ZACHEO T. 2011. ROS and NO production in compatible and incompatible tomato–*Meloidogyne incognita* interactions. *Eur. J. Plant Pathol.* 130:489–502.
- MITCHUM MG, HUSSEY RS, DAVIS EL, BAUM TJ. 2007. *Application of biotechnology to understand pathogenesis of nematode plant pathogens*. In *Biotechnology & Plant Disease Management*. Edited by Punja ZK, DeBoer S, Sanfacon H. CABI International; 58-86.
- MITTLER R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science* 7:405-410.
- NAKANO Y, ASADA K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 22: 867-880.
- RESENDE MLV, SALGADO SML, CHAVES ZM. 2003. Espécies ativas de oxigênio da resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 123-130.
- SATO K, KADOTA Y, SHIRASU K. 2019. Plant immune responses to parasitic nematodes. *Front. Plant Sci.* 10, 163.
- SHARMA P, JHA AB, DUBEY RS, PESSARAKLI M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012:1-26.
- SILVA JFV. 2001. Resistência Genética de soja a nematoides do gênero *Meloidogyne*, p. 95-127 in SILVA JFV. (Org.). *Relações parasitohospedeiro nas meloidoginoses da soja*. Londrina: Embrapa Soja.
- SILVA LC, DEBONA D, AUCIQUE-PÉREZ CE, OLIVEIRA JR, RIBEIRO-JÚNIOR JI, BRÁS VV, RODRIGUES FA. 2020. Physiological and antioxidant insights into common bean resistance to common bacterial blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 111:101505.
- WILLIAMSON VM. 1999. *Plant nematode resistance genes*. *Curr Opin Plant Biol*, 2:327-331.

Figura 1 – Média de penetração de juvenis de *Meloidogyne javanica* em cultivares de soja em diferentes tempos de coleta após inoculação. Itaara – RS, 2019.



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula comparam cultivares dentro de cada tempo; letras minúsculas comparam os tempos dentro de cada cultivar. Não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade.

Tabela I – Atividade enzimática de Peroxidase (POX), Ascorbato Peroxidase (APX), concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Malondialdeído (MDA) em plantas de soja submetidas a três densidades populacionais de *M. javanica* avaliadas em diferentes períodos após inoculação. Itaara – RS, 2019.

Densidades	POX (Peroxidase de fenóis) - ($mM \text{ min.}^{-1} \text{ mg Ptn}^{-1}$)				
	1 h	2 h	6 h	12 h	48 h
Sem Nematoides	23,40 aA	24,61 aA	24,98 aA	22,95 aA	20,65 aA
50 / J2	23,56 aA	37,03 bB	50,04 cB	27,57 aA	41,44 bB
5000 / J2	27,52 aA	44,87 bB	19,59 aA	31,14 aA	25,51 aA
10000 / J2	28,31 aB	19,91 aA	37,20 bB	15,15 aA	15,17 aA
	APX (Ascorbato Peroxidase) - ($mM \text{ min.}^{-1} \text{ mg Ptn}^{-1}$)				
	1 h	2 h	6 h	12 h	48 h
Sem Nematoides	56,46 aA	46,78 aA	49,2 aA	58,40 aA	45,21 aA
50 / J2	87,45 bA	131,69 bB	139,79 bB	99,76 bA	91,10 bA
5000 / J2	120,97 bB	142,94 aA	58,84 aA	72,11 aA	75,39 bA
10000 / J2	56,82 aA	78,17 bB	154,16 bB	55,02 aA	57,89 aA
	H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio) - $mM H_2O_2 \text{ g MF}^{-1}$				
	1 h	2 h	6 h	12 h	48 h
Sem Nematoides	83,44 aA	85,56 bA	79,56 aA	85,13 bA	79,47 aA
50 / J2	84,94 aB	67,15 aA	84,09 aB	80,44 bB	80,98 aB
5000 / J2	83,32 aB	72,79 aA	78,95 aB	82,87 bB	96,01 bC
10000 / J2	86,80 aB	80,10 bA	89,79 bB	74,13 aA	90,23 bB
	MDA (Malondealdeído) - $mm \text{ MDA kg MF}^{-1}$				
	1 h	2 h	6 h	12 h	48 h
Sem Nematoides	13,09 bA	13,62 bA	13,43 bA	13,66 cA	19,63 bB
50 / J2	11,67 bB	15,37 bC	12,47 bB	7,60 aA	8,30 aA
5000 / J2	7,26 aA	8,19 aA	7,51 aA	8,56 aA	6,88 aA
10000 / J2	14,70 cC	7,45 aA	8,76 aA	11,64 bB	8,91 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula comparam as densidades populacionais dentro de cada tempo e coleta; mesma letra maiúscula comparam os tempos de coleta dentro de cada densidade, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade.

Tabela II – Atividade enzimática das peroxidase (POX), Ascorbato peroxidase (APX), e a concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e Malondialdeído (MDA) em diferentes cultivares de soja em diferentes períodos após inoculação de *M. javanica*. Itaara – RS, 2019.

Cultivares	POX (Peróxidase de fenóis) - $\mu\text{M min.}^{-1} \text{mg Ptn}^{-1}$															
	Tempo 1: 6h				Tempo 2: 12h				Tempo 3: 24h				Tempo 4: 48h			
	S/I		C/I		S/I		C/I		S/I		C/I		S/I		C/I	
BMX-ATIVA RR	12,76	A α	15,59	A α	15,33	B α	17,66	A α	14,84	A α	16,99	A α	16,68	A α	18,38	A α
NA-5909 RG	14,77	A α	15,02	A α	10,20	A α	18,39	A α	13,04	A α	17,53	A α	13,44	A α	20,28	A α
SYN-VTOP RR	11,83	A α	25,99	B α	19,55	B β	23,61	B α	15,01	A α	26,28	B α	18,00	A β	25,90	B α
BMX-ÍCONE IPRO	17,89	B α	23,51	B α	16,51	B α	23,02	B α	19,82	B α	20,99	A α	17,38	A α	23,46	B α
Cultivares	APX (Ascorbato peroxidase) - $\mu\text{M min.}^{-1} \text{mg Ptn}^{-1}$															
	Tempo 1: 6h				Tempo 2: 12h				Tempo 3: 24h				Tempo 4: 48h			
	S/I		C/I		S/I		C/I		S/I		C/I		S/I		C/I	
BMX-ATIVA RR	34,16	A α	48,05	A β	48,05	A β	57,22	A α	48,88	A β	50,97	A α	47,93	A β	53,03	A α
NA-5909 RG	51,57	B α	62,38	B α	45,73	A α	51,20	A α	50,37	A α	50,86	A α	41,30	A α	52,59	A α
SYN-VTOP RR	50,48	B α	62,53	B α	57,61	A α	60,21	A α	55,68	A α	65,43	B α	48,29	A β	61,25	A β
BMX-ÍCONE IPRO	45,75	B α	47,26	A α	50,74	A α	53,46	A α	52,81	A α	60,64	B β	39,87	A α	61,43	A β
Cultivares	H ₂ O ₂ (Peróxido de Hidrogênio) - $\text{mM H}_2\text{O}_2 \text{ g mF}^{-1}$															
	Tempo 1: 6h				Tempo 2: 12h				Tempo 3: 24h				Tempo 4: 48h			
	S/I		C/I		S/I		C/I		S/I		C/I		S/I		C/I	

BMX-ATIVA RR	27,34	Aaα	31,16	Aaβ	25,74	Aaα	40,14	Bcβ	26,98	Aaα	35,65	Abβ	28,00	Aaα	34,46	Abβ
NA-5909 RG	26,03	Aaα	30,59	Aaβ	26,60	Aaα	30,57	Aaβ	26,94	Aaα	34,04	Abβ	27,04	Aaα	40,68	Bcβ
SYN-VTOP RR	24,04	Aaα	33,38	Aaβ	27,84	Abα	31,83	Aaβ	26,14	Aaα	32,91	Aaβ	29,49	Abα	37,09	Abβ
BMX-ÍCONE IPRO	26,81	Aaα	29,72	Aaα	26,66	Aaα	33,09	Abβ	27,81	Aaα	33,19	Abβ	25,54	Aaα	33,78	Abβ
MDA (Malondialdeído) - μm MDA kg MF⁻¹																
Cultivares	Tempo 1: 6h				Tempo 2: 12h				Tempo 3: 24h				Tempo 4: 48h			
	S/I		C/I		S/I		C/I		S/I		C/I		S/I		C/I	
BMX-ATIVA RR	13,36	Aaα	16,75	Bbβ	12,40	Aaα	12,17	Aaα	11,04	Aaα	10,06	Aaα	11,58	Aaα	11,53	Aaα
NA-5909 RG	12,70	Aaα	23,01	Ccβ	10,52	Aaα	12,06	Aaα	14,45	Baα	17,36	Bbβ	12,42	Aaα	17,44	Bbβ
SYN-VTOP RR	14,29	Aaα	16,89	Bbα	13,14	Aaα	12,89	Aaα	12,48	Aaα	11,90	Aaα	11,80	Aaα	12,60	Aaα
BMX-ÍCONE IPRO	15,70	Abβ	11,74	Aaα	19,38	Bcβ	12,28	Aaα	16,38	Bbα	25,08	Ccβ	12,74	Aaα	21,81	Cbβ

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula comparam as cultivares dentro de cada tempo e inóculo; letras minúsculas comparam os tempos dentro de cada cultivar e cada inóculo, alfabeto grego comparam inóculo dentro de cada cultivar e cada tempo αβ. Não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade. (S/I) = sem inoculação), (C / I) = Com inoculação.

Tabela III – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis Fator de Reprodução (FR), Peroxoxidase de Fenóis (POX), Ascorbato Peroxidase (APX), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), Malondialdeídos (MDA), Número de juvenis Penetrados às 6 horas (NP 6 horas), Número de juvenis Penetrados às 12 horas (NP 12 horas), Número de juvenis Penetrados às 24 horas (NP 12 horas) e Número de juvenis Penetrados às 48 horas (NP 48 horas). Itaara – RS, 2019.

VA/VA	FR	POX	APX	H ₂ O ₂	MDA	NP 6 h	NP 12 h	NP 24 h	NP 48 h
FR	1								
POX	-0,96*	1							
APX	-0,731ns	0,74ns	1						
H ₂ O ₂	0,38ns	-0,61ns	-0,36ns	1					
MDA	-0,053ns	0,29ns	-0,05ns	-0,901ns	1				
NP 6 h	0,75ns	-0,62ns	-0,15ns	-0,71ns	0,17ns	1			
NP 12 h	0,068ns	-0,17ns	0,48ns	-0,65ns	-0,71ns	0,64ns	1		
NP 24 h	-0,52ns	0,28ns	0,38ns	-0,66ns	-0,81ns	0,13ns	0,71ns	1	
NP 48 h	-0,35ns	0,20ns	0,69ns	-0,54ns	-0,74ns	0,32ns	0,92*	0,84ns	1

Significância dos valores de F: ** = 1 %; * = 5 %; e NS = não significativo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os resultados obtidos nos dois estudos realizados, entende-se que a utilização da rizobactéria *B. amyloliquefaciens* e do fungicida Piraclostrobina proporcionaram reduções significativas no fator de reprodução de *M. javanica* nas cultivares de soja BMX-Ativa RR, SYN-Vtop RR e NA-5909 RG em relação à testemunha. Apesar de as cultivares citadas apresentarem fatores de reprodução distintos (BMX-Ativa e NA-5909 RG >10,0 e SYN-Vtop < que 7,0), o efeito dos produtos estudados parece ter sido capaz de ativar as respostas de defesa nessas cultivares, interferindo na reprodução de *M. javanica* em seus tecidos.

Embora este estudo não tenha contemplado análises bioquímicas de enzimas associadas à defesa das plantas, os resultados apresentados deixam evidências de que a utilização de indutores como estratégia de manejo para o controle de *M. javanica* demonstra potencial, mesmo apresentando variação entre cultivares de soja, fato relatado em diversos estudos com indutores em patossistemas diferentes nos quais as variações culturais e genéticas podem interferir na ativação dos mecanismos de resistência.

Por outro lado, houve respostas distintas em relação aos parâmetros vegetativos, sendo verificados incrementos positivos nos tratamentos com o indutor *B. amyloliquefaciens* e negativos para Piraclostrobina. Embora essas respostas contrariem alguns estudos com tal indutor, esse efeito no crescimento das plantas pode estar associado ao provável gasto energético das cultivares devido à ativação dos seus mecanismos de resistência. Entretanto, isso não significa que, em condições de campo, tais resultados possam impactar negativamente na produtividade, haja vista que outros fatores estarão envolvidos, podendo minimizar ou potencializar tais efeitos.

Foi verificado que a infecção de *M. javanica* nas raízes das cultivares de soja aumentou a produção de H₂O₂ em todas as cultivares, independentemente do FR e do tempo de coleta. No entanto, as enzimas antioxidantes POX e APX tiveram uma correlação mais estreita com as cultivares com menor FR (SYN-Vtop RR e BMX-Ícone IPRO), indicando uma possível resposta mais rápida do complexo antioxidante, haja vista que ambas fazem parte de uma rede de sinalização ligada a mecanismos de defesa do hospedeiro.

No tocante a isso, na literatura, existem diversos estudos contemplando a cinética do estresse oxidativo associado à interação com patógenos biotróficos, entretanto ainda são escassos os estudos que contemplem esse patossistema, sendo este trabalho um dos primeiros

a gerar informações relacionadas ao comportamento de diferentes cultivares de soja diante desse importante parasita.

Dado o exposto, esses resultados mostraram que as enzimas antioxidantes podem servir como marcadores de estresse oxidativo e estão ligadas ao fator de reprodução das cultivares; contudo, pesquisas adicionais deverão ser conduzidas com mais cultivares de soja para confirmar tais resultados obtidos neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, J. N. **Plant Pathology**. New York: Academic Press, 2005. 887 p.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology** **55**, Switzerland, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARAÚJO, F. F.; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 2, p. 220-224, 2012.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, maio, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_12_10_37_57_boletim_graos_mai_2017.pdf>. Acesso em: 20 maio 2017.
- DIAS, W. P. et al. Nematoides em soja: identificação e controle. **Circular Técnica**, Londrina, n. 76, p. 1-8, 2010.
- DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Induced resistance in the nematodes control. **African Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 8, n. 20, p. 2312-2318, May, 2013.
- DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil**, The Hague, NL, v. 288, n. 1, p. 31-45, 2006.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Tecnologia de produção de soja: região central do Brasil 2007. Londrina: Embrapa Soja, 2006. 225 p. (Série Sistemas de produção, 11). Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/tpsoja_2007_000g0v67mto02wx5ok00gmbp4qhts2gj.pdf. Acesso em: 13 out. 2017.
- FARIA, C. et al. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematóide-planta. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Lavras, MG, v. 11, p. 373-410, 2003.
- FERRAZ, B. C. C. L. et al. **Relação parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. 1. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 127 p.
- FERRAZ, S. et al. **Manejo sustentável de fitonematoides**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2010. 306 p.
- KYNDT, T. et al. Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. **New Phytologist**, [S. l.], v. 196 p. 887-900, Nov., 2012.
- MCCARTER, J. Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematode. In: _____ BERG, R.; TAYLOR, C. (Ed.). **Cell biology of plant nematode parasitism**. Berlin: Springer, 2009. 15 v., p. 239-267.
- MELILLO et al. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomatroot-knot nematode interactions. **New Phytologist**, [S. l.], v. 170, p. 501-12, 2006.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, [S. l.], v. 7, p. 405-410, 2002.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, [S.l.], v. 15, p. 152-158, Mar., 2016.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007. p. 269.

ROMEIRO, R. S. PGPR e indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 26, p. 177-184, 2000.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A World Perspective on Nematology: The Role of the Society. In: ____ VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on Nematology**. Hyattsville, Maryland, p. 7-20, 1987.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, [S. l.], v. 2012, p. 1-26, 2012.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Fribourh, CH, v. 35, p. 235-270, 1997.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473 p.

WILLIAMSON, V. M. Plant nematode resistance genes. **Curr Opin Plant Biol**, [S. l.], v. 2, p. 327-331, 1999.