

Setembro e Outubro de 1985

VOL. XXXII

N.º 183

Viçosa — Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**BIOLOGIA DE *Meloidogyne exigua*. I.
DESENVOLVIMENTO EMBRIOGÊNICO
E EFEITO DA TEMPERATURA
NA EMBRIOGÊNESE^{1/}**Rosângela D'Arc de Lima^{2/}
Silamar Ferraz^{3/}

1. INTRODUÇÃO

O estudo do parasitismo de nematóides em cafeeiro foi iniciado no final do século passado (6), na antiga província do Rio de Janeiro, tendo o agente causador da enfermidade sido denominado *Meloidogyne exigua*, por GOELDI, em 1887 (5).

Para elucidar aspectos biológicos desse nematóide, MENDES *et alii* (8) realizaram estudos acerca do complexo *Coffea arabica* x *Meloidogyne exigua*, considerando a histopatologia de raízes. Até o momento, porém, maiores informações sobre a biologia do patógeno não são disponíveis.

O processo embriogênico de nematóides já é conhecido desde 1899, quando Boveri, citado por BIRD (2), estudou a sequência e as características do desenvolvimento de larvas de *Parascaris equorum*.

TYLER (10) observou que, dos ovos de *Heterodera marioni* (= *Meloidogyne* sp.) «in vitro», as larvas levaram nove dias, a 27°C, e 31 dias, 16,5°C, para eclodir. A embriogênese de *M. naasi* exigiu 15-17 dias, a 22-26°C, para desenvolver ovos de uma célula em larvas de segundo estágio e os primeiros movimentos do embrião tornaram-se visíveis 30-60 horas após a especialização celular (9). A fase pré-parasítica de *M. incognita*, segundo VILLALBA GAULT (12), durou de 11 a 14 dias, a 24 ± 3°C.

^{1/} Projeto de pesquisa parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq.

Recebido para publicação em 13/9/1984.

^{2/} Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais — EPAMIG Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG.

^{3/} Departamento de Fitopatologia da U.F.V. CEP 36570 Viçosa, MG.

BIRD (2) estudou a influência da temperatura na embriogênese de *M. javanica* e verificou que as taxas de desenvolvimento, a 25 e 30°C, foram semelhantes e indicaram que o ótimo termal para todas as fases da embriogênese encontrava-se entre essas temperaturas. Observou que a mortalidade dos embriões, a 30°C, era duas vezes maior que a 25°C, que, por sua vez, pouco diferiu da taxa de mortalidade a 20°C, quando o desenvolvimento embriogênico foi bem mais lento. FERRIS e DU VERNAY (4) mostraram que a taxa de mortalidade de ovos de *M. arenaria* era alta durante a primeira semana, tanto para as temperaturas mais baixas como para as mais altas, e que ovos nos estádios iniciais de desenvolvimento eram mais sensíveis à temperatura que ovos mais desenvolvidos (posteriores à gastrulação). Para *M. incognita* e *M. hapla*, VRAIN e BARKER (13) verificaram que o desenvolvimento embriogênico é bastante lento a 10 e 12°C, com elevada percentagem de ovos anormais e, ou, mortos.

Tendo em vista a exigüidade de informações com respeito à embriologia de *M. exigua*, foi desenvolvido o presente trabalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo usado no ensaio era proveniente de subcultura de uma população de *M. exigua*, originalmente coletada em cafeeiro (*Coffea arabica* cv. 'Mundo Novo'), no município de Ponte Nova, MG. Para a propagação dessa subcultura, ootecas foram inoculadas em mudas de cafeeiro 'Mundo Novo' com 3-4 pares de folhas, na proporção de uma ooteca por planta, no momento do transplante das mudas para vasos que continham uma mistura de terço e areia, na proporção de 1:1, previamente tratados com brometo de metila. As mudas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação para a multiplicação do inóculo.

Massas de ovos, retiradas das raízes lavadas seis meses após a inoculação, com o auxílio de estiletes, em microscópio estereoscópico, foram transferidas para uma gota de água estéril, com 50 ppm de sulfato de estreptomicina, em lâmina escavada, onde foram selecionados ovos em estágio de uma ou duas células. Esses ovos foram depositados, aos pares, sobre lamínulas que continham uma gotícula da mesma solução utilizada na seleção de ovos. Cuidadosamente, cada lamínula foi vertida sobre lâmina escavada, na qual, junto aos bordos da escavação, havia sido disposta uma camada de vaselina para impedir a evaporação. Cerca de dez lâminas, por tratamento, foram montadas e colocadas em placas de Petri (150 x 15 mm) forradas com papel de filtro umedecido, à semelhança de câmara úmida. As lâminas assim preparadas foram incubadas, a 15, 20, 25, 30 e 35°C, e permaneceram aparentemente livres de contaminação durante o período necessário para a avaliação do desenvolvimento embriogênico.

As observações foram feitas a cada quatro horas, desde o início do processo até a completa formação da larva do segundo estágio. A duração de cada estágio de desenvolvimento foi calculada pela média das observações de 20 ovos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Evolução do Processo Embriogênico

Ovos selecionados em estágio de uma e duas células tinham forma elipsoidal e mediam, em média, 83,6 x 40,1 µm (77-89 x 39-42 µm; n = 20). Os ovos no estágio de uma célula apresentavam protoplasma com muitos grânulos esféricos, todos envolvidos por uma membrana fina e transparente, a membrana vitalina, que se apresentou conspicua em ambas as extremidades em que o protoplasma se contraiu (Fig. 1A). Num plano transversal, desenvolveu-se uma constrição no citoplasma,

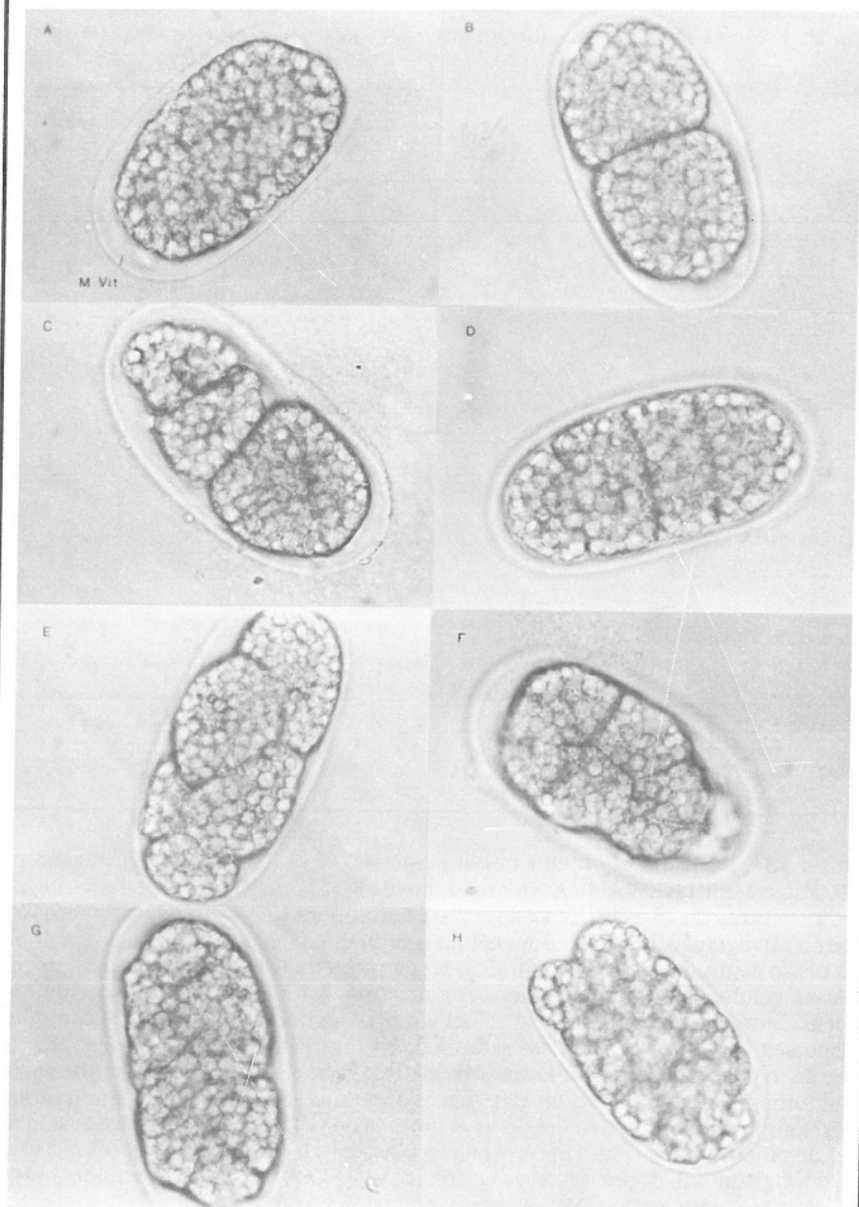


FIGURA 1 - Fases da Embriogênese de *M. exigua* (de A a H Estão Representados, Respectivamente, os Estádios de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 14 Células. M. vit. = membrana vitelina). 640 X.

enquanto o núcleo se apresentava ainda indiviso. O tempo necessário para que a primeira clivagem ocorresse, às temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C, está exposto no Quadro 1. Dessa clivagem resultaram duas células, ou blastômeros (Fig. 1B), sendo

QUADRO 1 - Duração, em horas, das fases do desenvolvimento embriogênico de *M. exigua*, com diferentes temperaturas.

Fase embriogênica	15°C	20°C	25°C	30°C
Uma célula	22-26 ⁽¹⁾	20-24	18-22	16-20
Duas células	22-26	12-16	7-11	6-10
Três células	9-13	7-11	3-7	3-7
Quatro células	19-23	10-14	4-8	4-8
Seis células	34-38	10-14	7-11	6-10
Oito células	36-40	11-15	9-13	8-12
Dez células	45-49	28-32	21-25	20-24
Blástula	32-36	26-30	20-24	20-24
Gástrula	36-40	28-32	20-24	22-26
Dif. de tecidos	82-86	38-42	34-38	30-34
Embrião	24-28	16-20	6-10	4-8
Larva 1º estágio	160-172	78-88	74-84	74-84
Larva 2º estágio	180-190	110-120	80-90	60-79
Total (dias)	29,0-32,0	16,0-19,0	12,0-15,0	11,0-14,0

(1) Média de 20 observações.

um, o «S», ligeiramente maior que o posterior, «P₁» (terminologia utilizada por CROLL e MATTHEWS (3). Aproximadamente 6-11 horas depois dessa divisão, nas temperaturas de 25 e 30°C, e 22-26 e 12-16 horas, para 15 e 20°C, o blastômero «S₁» sofreu clivagem, originando uma célula terminal, «A», e outra central, «B». O plano dessa segunda divisão foi paralelo ao da primeira (Fig. 1C) e, no arranjo dessas células, embora, para a maioria dos ovos estudados, fosse obedecida uma linearidade, em relação ao eixo maior do ovo, algumas vezes foi verificada uma disposição em forma de T. Esse estágio de três células tem curta duração. Logo a seguir, o blastômero «P₁» sofreu divisão, em plano transversal, resultando nos blastômeros «P₂» e «S₂» (Fig. 1D). A célula «A» sofreu nova divisão, agora no sentido longitudinal, desenvolvendo as células «a» e «α», num estágio rápido e instável de cinco células (Fig. 1E). A seguir, o blastômero «B» originou as células «b» e «β» longitudinal, desenvolvendo as células «a» e «α», num estágio rápido e instável de cinco células (Fig. 1E). A seguir, o blastômero «B» originou as células «b» e «β», após sofrer clivagem também longitudinal. O ovo mostrou, então, um estágio de seis células (Fig. 1F). A duração de cada estágio, acompanhada nas quatro temperaturas, pode ser vista no Quadro 1. De forma semelhante, o blastômero «S₂» originou as células «E» e «MSt». O ovo apresentou-se octocelular (Fig. 1G) quando, posteriormente, a célula «P₂» sofreu clivagem e deu origem a «P₃» e «S₃». A partir desse ponto, tornou-se difícil acompanhar as divisões celulares individualmente, por causa da intensa granulação do citoplasma e do movimento de ro-

tação das células. A Fig. 1H mostra um ovo com quatorze células, estágio imediatamente anterior ao de blástula, que, segundo a literatura (9), apresenta-se com 16 a 20 células, mas, aqui, foi diferenciado por apresentar elevado grau de granulação (Fig. 2A). Aproximadamente, em 20-24 horas sob as temperaturas de 25 e 30°C, mas em 26-30 e 32-36 horas às temperaturas de 20 e 15°C, respectivamente, após o estágio de blástula, teve início a gastrulação, estágio em que tem início a diferenciação dos tecidos do embrião (Fig. 2B). Este estágio se caracteriza por rápida divisão das células periféricas, ocorrendo um arranjo dessas células, mais claras e menos globulares, circundando grande número de células agregadas, de coloração escura e aspecto globular. O próximo estágio, chamado diferenciação de tecidos, é uma sequência da gastrulação e constitui o primeiro sinal visível da diferenciação das células, quando o ectoderma é diferenciado por uma ou duas camadas de células pequenas, menos globulares, encerrando uma massa interna de células maiores e mais granulosas do endoderma (Fig. 2C). Na Fig. 2D são mostrados o final desse estágio e o início da conformação do embrião. Este se tornou cilíndrico e evoluiu até apresentar-se vermiforme (Figs. 2E e F). Também nesse estágio foram verificados, visivelmente, os primeiros movimentos, inicialmente na região da cauda e, posteriormente, na região anterior do corpo, até que todo o embrião, já mais fino e mais longo, se movimentasse para a frente e lateralmente, em movimentos rítmicos. A região anterior do embrião tornou-se hialina e as paredes das células menos conspícuas, originando o estomódio, ou abertura bucal, e o esôfago. Os três quartos posteriores do embrião já mostravam contorno definido, mais granuloso e escuro, daí devendo resultar o futuro intestino, as gônadas e a região da cauda. A futura junção esôfago-intestinal já se apresentava conspícua nesse estágio (Figs. 2E e 2F). Este é o estágio marcante entre o final do desenvolvimento embriogênico e o início do primeiro estágio larval. Até aí foram necessários 14-15 dias, à temperatura de 15°C, para completar essa fase de desenvolvimento; para a temperatura de 20°C, foram gastos 9-10 dias; entretanto, para 25 e 30°C, o desenvolvimento foi semelhante, tendo sido necessários 6-7 dias.

Um maior alongamento do corpo da futura larva foi acompanhado por uma subsequente redução na largura do corpo, e ambas as extremidades da jovem larva eram arredondadas (Fig. 1F). Formado o embrião, nenhuma divisão celular pareceu ocorrer, a não ser as do intestino e dos órgãos genitais. Portanto, o crescimento da larva está mais relacionado com o aumento do tamanho da célula do que com o número de células. O alongamento do corpo continuou e algumas de suas dobras podiam ser vistas dentro dos ovos. Nesse estágio, o estilete ainda não estava desenvolvido, entretanto uma linha hialina podia ser vista na região labial da larva. Já podia ser observado um suave contorno do esôfago, porém o bulbo mediano não mostrava placas valvulares nem musculatura bem desenvolvidas. Mais no final desse estágio, as anelações do corpo começaram a aparecer e a primeira ecdise larval ocorreu logo após o surgimento de uma cavidade hialina na região labial. O tempo necessário para que a primeira muda ocorresse foi de 22-24 dias após a primeira clivagem a 15°C; 12 a 14, 9,5 a 11,5 e 9 a 11 dias, a 20, 25 e 30°C, respectivamente. Nesse período, as larvas tornaram-se imóveis, reiniciando a atividade depois de a «cabeça», ou parte anterior do corpo, ter-se retraído da primeira cutícula (Fig. 2G). A larva do segundo estágio, ainda dentro da antiga cutícula, já havia desenvolvido o estilete, com nódulos basais, placas valvulares e musculatura no bulbo mediano. A L₂ (larva do segundo estágio) movia-se ativamente dentro do ovo e, ocasionalmente, impulsionava o estilete através da primeira cutícula, até que emergisse da cutícula da primeira ecdise. O desenvolvimento prosseguiu dentro do ovo por mais alguns dias, resultando numa larva de segundo estágio bem formada, caracterizada pelo corpo finamente anelado, estilete com nódulos basais esclerotizados, esôfago bem diferenciado, poro excretor visível e cauda afilada (Fig. 2H). Nesse estágio, a larva ocupou todo o espaço do ovo e se

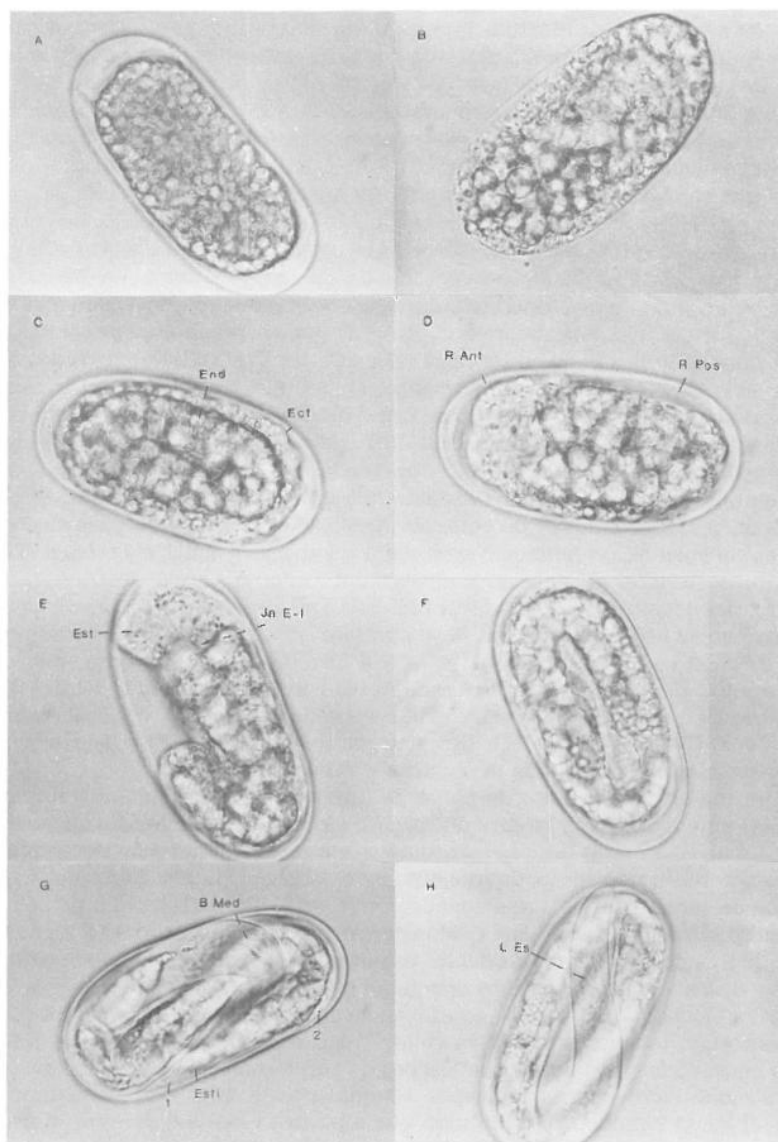


FIGURA 2 - Fases da Embriogênese de *M. exigua* (A - Blástula; B - Gástrula; C e D - Início e Final do Estádio da Diferenciação de Tecidos, Respectivamente, Mostrando Endoderma e Ectoderma, Regiões Anterior e Posterior do Corpo; E - Embrião, Mostrando Estomódeo e Junção Esôfago-Intestinal; F - Larva de 1º Estádio; G - 1ª Ecdise de Larva de 1º Estádio, Mostrando Bulbo Mediano, Estilete, Cutícula do 1º Estádio Larval e a Larva de 2º Estádio; H - Larva do 2º Estádio, dentro do Ovo, Mostrando Lúmen do Esôfago). 640 X.

dobrou cerca de 4-5 vezes, internamente ao ovo. Nenhuma eclosão ocorreu às temperaturas de 20, 25 e 30°C, embora a 15°C, muitos dias após o total desenvolvimento larval, umas poucas larvas chegassem a eclodir.

A embriogênese de *M. exigua* segue um comportamento similar ao de outras espécies de *Meloidogyne* (7, 9, 10, 12, 14). Embora não tenha sido relatado para outras espécies de *Meloidogyne*, o blastômero anterior, no ovo bicelular de *M. exigua*, mostrou-se ligeiramente maior, em relação ao posterior, fato também observado em *Ditylenchus dipsaci* (16) e *Radopholus similis* (11).

O processo embriogênico aqui descrito, à semelhança dos de outras espécies do gênero (2, 3, 9), mostrou-se altamente dinâmico e, antes mesmo que a primeira clivagem ocorresse, o citoplasma mostrou-se em movimento, quando cuidadosamente observado, havendo um contínuo movimento celular em todos os estádios da embriogênese. Contudo, o primeiro sinal facilmente visível de movimento ocorreu logo após a diferenciação de tecidos, quando surgiu o embrião, e continuou mais ou menos constante até a total formação da larva do segundo estádio, como em *M. naasi* (9).

A 25°C, foi observada, num dos ovos, a separação de uma pequena porção de citoplasma no estádio tetracelular, a qual permaneceu indivisa, enquanto o citoplasma restante seguiu o curso normal de desenvolvimento. Esse fenômeno incomum foi também observado em *M. arenaria* por BERGÉ e CUANY (1). WOOD *et alii* (15), estudando determinantes de desenvolvimento em embrião do nematóide *Caenorhabditis elegans*, obtiveram larvas que cresceram em adultos férteis a partir de embriões que tinham perdido 20% do citoplasma do ovo unicelular ou 60% do citoplasma de quaisquer células diferentes durante as primeiras clivagens.

3.2. Influência da Temperatura na Embriogênese

A duração do desenvolvimento embriogênico, a diferentes temperaturas, variou consideravelmente (Quadro 1). Enquanto a 15°C os ovos estavam no estádio unicelular, a 25 e 30°C a primeira clivagem já havia ocorrido. Durante toda a embriogênese, o desenvolvimento, a 20°C, mostrou-se sempre intermediário às temperaturas de 15 e 25-30°C, e pouca diferença no comportamento foi observada entre as duas últimas temperaturas. Na Figura 3, uma síntese da embriogênese mostra como a temperatura interfere no processo embriológico. Até atingir o estádio de dez células, aproximadamente 2,5 vezes mais tempo foi necessário a 15°C, em comparação com 25 e 30°C, e o dobro do tempo em relação a 20°C, fato que se repetiu para os estádios de embrião e larva do segundo estádio.

O desenvolvimento, até o primeiro estádio larval, ocorreu aos 25 dias da incubação e teve duração de, aproximadamente, 6-7 dias, à temperatura de 15°C, e cerca de 85% dos ovos atingiram esse estádio (Fig. 4). A 20°C, a duração do estádio foi de 4-5 dias e apenas 30% dos ovos não conseguiram desenvolver-se até o primeiro estádio larval. Já a 25°C, cerca de 85% dos ovos atingiram esse estádio de desenvolvimento. Porém, a 20°C, apenas 50% dos ovos apresentaram desenvolvimento até larva do primeiro estádio, ocorrido em 2-3 dias. A 35°C, não foi observado nenhum desenvolvimento embriogênico.

A temperatura interferiu no processo embriogênico de *M. exigua*, à semelhança do que ocorreu com *M. javanica* (2, 14), uma espécie de *Meloidogyne* estudada por TYLER (10), *M. incognita* e *M. hapla* (13). BIRD (2) verificou que a mortalidade de embriões, a 35°C, foi duas vezes maior que a 25°C, temperatura que, por sua vez, pouco diferiu de 20°C. Pequena diferença na percentagem de mortalidade de *M. exigua* foi observada entre 15, 20 e 25°C, porém foi notável com 30°C, quando apenas 50% dos ovos completaram o desenvolvimento. Estudando o efeito das baixas temperaturas sobre ovos de *Meloidogyne*, VRAIN e BARKER (13) notaram

que a percentagem de ovos anormais em *M. incognita* também aumentava às temperaturas de 10 e 12°C.

4. RESUMO

No estudo do desenvolvimento embriogênico de *M. exigua*, as clivagens foram

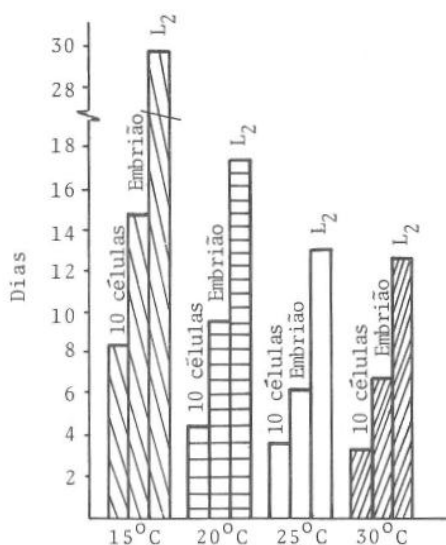


FIGURA 3 - Comparação, em dias, entre as fases de dez células, embrião e segundo estágio larval de *M. exigua*, em quatro diferentes temperaturas.

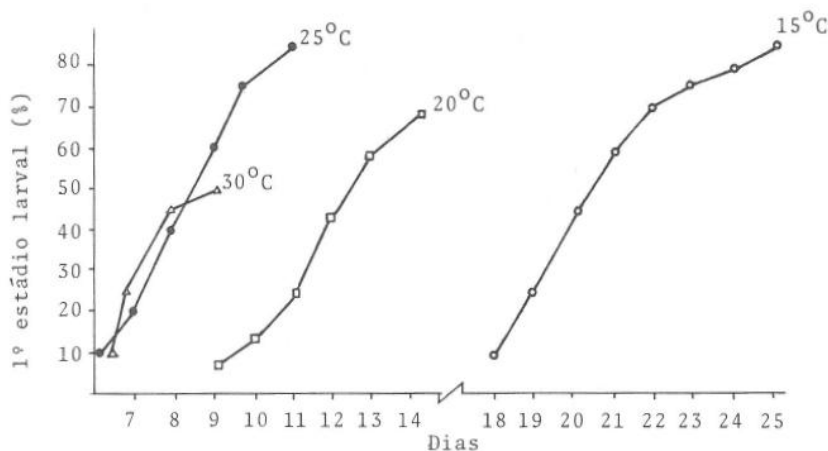


FIGURA 4 - Evolução da embriogênese de *M. exigua*, desde ovo com uma ou duas células até 1º estágio larval, a 15, 20, 25 e 30°C.

acompanhadas isoladamente, em cada célula ou blastômero, até o estágio de oito células. Até aí, a duração foi de 2-3 dias, entre 25 e 30°C, quando o desenvolvimento foi mais rápido. Esse desenvolvimento seguiu pelos estádios de blástula, gástrula e diferenciação de tecidos até o aparecimento do embrião, quando, visivelmente, foram verificados os primeiros movimentos, com 6-8 dias (a 25-30°C), 9-11 (a 20°C) e 15-17 dias (a 15°C). O embrião sofreu maior alongamento, com consequente redução da largura de corpo, até formar a larva do primeiro estágio, que se apresentou com algumas estruturas já delineadas e anelações na cutícula. Posteriormente, essa larva sofreu a primeira ecdise, ainda dentro do ovo, originando o segundo estágio larval, totalmente desenvolvido. O processo embriogênico, a 25 e 30°C, não variou e durou cerca de 11-15 dias; a 20°C, durou de 16 a 19 dias, sendo mais prolongado a 15°C, quando o desenvolvimento do ovo unicelular, até a completa formação do segundo estágio larval, foi de 29-32 dias. A 35°C, não foi observado nenhum desenvolvimento.

5. SUMMARY

(BIOLOGY OF *Meloidogyne exigua* (NEMATODA: MELOIDOGYNIDAE). I. EMBRYOGENIC DEVELOPMENT AND THE EFFECT OF TEMPERATURE ON EMBRYOGENESIS)

The embryogenesis of *Meloidogyne exigua* was studied under different temperature regimes. From the first cleavage of the egg, which gave rise to two equal cells or blastomeres, up to the 8-cell stage, the development was followed for each cell individually. The duration to this point of development was 2-3 days under the temperatures of 25° and 30°C which were more favorable than were the others. This development was followed by the blastula, then gastrula stage, tissue differentiation, and embryo formation. The first visible movements were observed in 6-8 days at 25° and 30°C, in 9-11 days at 20°C, and 15-17 days at 15°C. The embryo then began to elongate with a concomitant reduction in body width forming the first larval stage. The first molt occurred resulting in a fully-developed second larval stage within the egg. The whole process took 11-15 days at 25° and 30°C, 16-19 days at 20°C, and 29-32 days at 15°C. No development occurred at 35°C.

6. LITERATURA CITADA

1. BERGE, J. & CUANY, A. Embryogenesis of *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood 1949. *Bulletin OEPP*. 9:73-83, 1973. In: *Helminthological Abstract* 42(4):957, 1973 (abstract).
2. BIRD, A.F. Influence of temperature on embryogenesis in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 4(3): 206-213, 1972.
3. CROLL, N.A. & MATTHEWS, B.E. *Biology of nematodes*. London, Blackie, 1977. 201 p.
4. FERRIS, H. & DU VERNAY, H.S. Development of models for death rate of *Meloidogyne arenaria*, and their inclusion in a computer simulator. In: Annual Abstracts, Society of Nematologists. *Journal of Nematology*, 9(4):267, 1977.
5. GOELDI, E.A. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na província do Rio de Janeiro. *Archivos do Museu Nacional* 8: 7-124, 1892.

6. JOBERT, M.C. Sur une maladie du caféier observée au Brésil. In: GOELDI, E.A. Relatório sobre a moléstia do caféiro na Província do Rio de Janeiro. *Archivos do Museu Nacional*, 8: 103-105, 1892.
7. LAL, B.S. & DASS, K.K. On the biology of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* var. *acrita* Chitwood (Nematoda: Heteroderidae). *Science and Culture* 25(4): 263-265, 1955.
8. MENDES, B.V.; FERRAZ, S. & SHIMOYA, C. Observações histopatológicas de raízes de caféiro parasitadas por *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887. In: REUNIÃO DA SOC. BRAS. DE NEMATOLOGIA, 2.^a, Piracicaba, 1976. Trabalhos Apresentados, Piracicaba, 1977, p. 207-229.
9. SIDDIQUI, I.A. & TAYLOR, D.P. The biology of *Meloidogyne naasi*. *Nematologica*, 16: 133-143, 1970.
10. TYLER, J. Development of the root-knot nematodes as affected by temperature. *Hilgardia*, 7(9): 391-415, 1933.
11. VAN WEERDT, L.G.V. Studies on the biology of *Radopholus similis* (Coob, 1893) Thorne, 1949. Part 3. Embryology and post-embryonic development. *Nematologica*, 5(1): 43-52, 1960.
12. VILLALBA G., D.A.V. *Ciclo de vida de Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, en *Coffea arabica* var. *Caturra*. Bogotá, Univ. Nac., 1980. 86 p. (Tese M.S.).
13. VRAIN, T.C. & BARKER, K.R. Influence of low temperature on development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* eggs in egg-masses. *Journal of Nematology*, 10(4): 311-313, 1978.
14. WALLACE, H.R. The influence of temperature on embryonic development and hatch in *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 17(2): 179-186, 1971.
15. WOOD, W.B.; LAUFER, J.S. & STROME, S. Developmental determinants in embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology*, 14(2): 267-273, 1982.
16. YUKSEL, H.S. Observations on the life cycle of *Ditylenchus dipsaci* on onion seedlings. *Nematologica*, 5(4): 289-296, 1960.