Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Presença de nematoides em plantas de soja: relação com a ocorrência de sementes esverdeadas e seu potencial fisiológico

Victor Augusto Forti

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2013

Victor Augusto Forti
Engenheiro Agrônomo

Presença de nematoides em plantas de soja: relação com a ocorrência de sementes esverdeadas e seu potencial fisiológico

Orientador: Prof. Dr. **SILVIO MOURE CICERO**

Co-orientador: Prof. Dr. **MÁRIO MASSAYUKI INOMOTO**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Forti, Victor Augusto
Presença de nematoides em plantas de soja: relação com a ocorrência desementes esverdeadas e seu potencial fisiológico / Victor Augusto Forti. - - Piracicaba, 2013.
104 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Meloidogyne javanica 2. Pratylenchus brachyurus 3.Fenologia 4. Senescência 5. Produção de sementes I. Título

CDD 633.34
F741p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos Meus Pais,

Fausto e Téo

Dedico com o mais profundo sentimento de agradecimento à estes dois, que sempre fizeram de tudo para que eu conseguisse atingir este sonho,

aos meus irmãos Rui, Fábio e Carla;
aos meus cunhados (as) Renata, Elisângela e Biofá
aos meus sobrinhos (as) Rafaele, Raiane e Caio e
em especial , à minha namorada Heloisa Malaguetta

AGRADECIMENTOS

Á Deus pelo Dom da Vida e por ter sido sempre presente em todas as etapas desta caminhada.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela minha formação acadêmica.

Ao meu grande amigo e orientador Prof. Dr. Silvio Moure Cicero, pela dedicada orientação, companheirismo e por ser um grande exemplo profissional.

Ao meu amigo e co-orientador Dr. Mário Massayuki Inomoto pelo aceite e disponibilidade em me co-orientar neste trabalho.

Aos professores e amigos Prof. Dr. Julio Marcos Filho e Prof. Dra. Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre pela valiosa contribuição em minha formação.

Á minha co-orientadora na Polônia Dr. Elwira Sliwinska pela disponibilidade e apoio durante a etapa do doutorado sanduíche.

Ao meu co-orientador na Holanda Dr. Henk Yalink e ao Rob Van de Schorr pelo auxilio e dedicação durante essa etapa do projeto.

Á Eng. Agr^{a}. Ms. Helena Maria Pascarin Chamma e à Eng. Agr^{a}. Maria Heloisa D. Moraes, pela amizade, apoio, paciência e ensinamentos transmitidos.

À bióloga Sonia Antedomico, pela amizade e apoio nas análises nematológicas.

Ao Dr. José de Barros França Neto, pelo suporte durante minha formação profissional e conselhos em importantes momentos dessa caminhada.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Francisco (Xiquinho), Hodair, Rafael, Adilson, Ticão, João e Zezé, pela amizade e convívio.

À coordenação do curso de pós-graduação em fitotecnia pela oportunidade.

À secretária do programa de pós-graduação em fitotecnia, Luciane Lopes Toledo, pela amizade e apoio constante.

Ao CNPq, pela bolsa concedida no período de março de 2010 a novembro de 2010.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida no período de dezembro 2010 a fevereiro de 2013 e apoio financeiro.

À empresa Sementes Adriana pelo fornecimento das sementes utilizadas na pesquisa e aos funcionários dessa empresa pela amizade e participação na minha formação.

Aos meus grandes amigos do laboratório de sementes Cristiane (G), Taís, Fábio Socolowski, Renata, Paty, Tathi, Nilce, Zé Luiz, Bruna, Roberta, Vanessa, Marcão, Liana, Ana Lúcia, P-rô, Pedro, Túlio, Daiane, Cristiane, Cartiane, Juliana, Denis, Natalia, Nayara, Cibele, Márcio, Clissia, Simone, Mário, Teresa Cristina, Bruna, Elen, Vivian, Fabricio, Nathan e Fábio pela amizade e auxilio em muitos momentos.

Aos amigos do laboratório de nematologia, Rosana Bessi, Mauro, Ricardo, Pedro, Tiarla, Joaquim e Cláudia.

Aos amigos da Polônia, Agáta, Monika, Iwona, Beata e Rafal.

Aos amigos feitos na Holanda, Cristiane, Renake, Débora, Joaquim, Mina, Álvaro, Chia-Kai, Carlos, Elisa, Kamlesh, Francisco, Melike, Chantall, Maria Cecília e Paulo.

Aos meus amigos irmãos G-kitibá, A-tnas, Daninhas, Ascov, Bagaço, Paπta, 2X0, Modelo, $(Ling)^2$, Romano, Santinha, Romera (Ju), Soprano e ao Esalq-X pela intensa convivência e amizade durante o período de graduação.

Ao pessoal do Roberts, Rapha, Eriketa, Lisa, Renata, Silvia, Everton, Ana e Leticia e Tathi.

À todo o pessoal de GELQ 2007, pela incomparável convivência.

À todo o ano K-ramujo (Formandos 2007) da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Em especial, ao "anjo" motociclista (com certeza enviado por Deus) que encontrou e devolveu meu caderno "verde" com todos os dados e anotações do doutorado e a todos os que o auxiliaram. Sem estes, sem dúvida não conseguiria terminar esta etapa.

Enfim, para todos aqueles de alguma maneira colaboraram para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
2 DESENVOLVIMENTO 15
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1.1 Nematoides na cultura da soja 15
2.1.1.1 *Meloidogyne javanica* 16
2.1.1.2 *Pratylenchus brachyurus* 18
2.1.2 Sementes esverdeadas de soja e potencial fisiológico 20
2.1.2.1 Sementes esverdeadas de soja 20
2.1.2.2 Potencial fisiológico de sementes esverdeadas de soja 22
2.2 Material e Métodos 24
2.2.1 Obtenção do inóculo 24
2.2.2 Experimento I 25
2.2.2.1 Avaliação da fenologia 26
2.2.2.2 Massa de matéria seca de sementes 26
2.2.2.3 Massa de 100 sementes 26
2.2.2.4 Massa de matéria seca de parte aérea 26
2.2.2.5 Grau de umidade 26
2.2.2.6 Teste de germinação 26
2.2.2.7 Teste de envelhecimento acelerado 26
2.2.2.8 Teste de condutividade elétrica 27
2.2.2.9 Determinação de sementes esverdeadas - método visual 27
2.2.3 Experimento II 28
2.2.4 Experimento III 29
2.2.4.1 Teste de tetrazólio 31
2.2.4.2 Teste de emergência de plântulas em areia 31
2.2.4.3 Análise computadorizada de imagens de plântulas 31
2.2.4.4 Fluorescência de clorofila 31
2.2.4.5 Citometria de fluxo 32
2.2.5 Análise estatística 34
2.3 Resultados e Discussão 34

2.3.1 Experimento I 34
2.3.1.1 Avaliações do desenvolvimento e fenologia das plantas 34
2.3.1.2 Avaliações de nematoides, desempenho de plantas e de sementes 39
2.3.1.2.1 *Meloidogyne javanica* 39
2.3.1.2.2 *Pratylenchus brachyurus* 45
2.3.2 Experimento II 49
2.3.3 Experimento III 52
2.3.3.1 Avaliações do desenvolvimento e fenologia das plantas 52
2.3.3.2 Avaliações de nematoides, desempenho de plantas e de sementes 59
2.3.3.2.1 *Meloidogyne javanica* 61
2.3.3.2.2 *Pratylenchus brachyurus* 70
2.3.3.3 Fluorescência de clorofila 77
2.3.3.3.1 *Melodogyne javanica* 77
2.3.3.3.2 *Pratylenchus brachyurus* 78
2.3.3.4 Citometria de fluxo 81
2.3.3.4.1 *Meloidogyne javanica* 81
2.3.3.4.2 *Pratylenchus brachyurus* 84
2.3.4 Considerações finais 91
3 CONCLUSÕES 93
REFERÊNCIAS 95

RESUMO

Presença de nematoides em plantas de soja: relação com a ocorrência de sementes esverdeadas e seu potencial fisiológico

A ocorrência de estresses abióticos e bióticos em plantas imaturas de soja, o que inclui a presença de nematoides, podem resultar em morte prematura da planta ou maturação forçada e produzir sementes esverdeadas e de baixo potencial fisiológico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* em plantas de soja e a relação com o desenvolvimento da planta, com a ocorrência de sementes esverdeadas e com o potencial fisiológico das sementes. Para isso, foram conduzidos três experimentos. O experimento I foi realizado utilizando plantas da cultivar Pintado, as quais foram submetidas à diferentes tratamentos de inóculo inicial e avaliadas quanto à fenologia e à produtividade e as sementes quanto ao potencial fisiológico. No experimento II foi analisada a resistência de dez cultivares de soja à *M. javanica* e *P. brachyurus.* No experimento III foram utilizadas plantas de duas cultivares de soja (TMG-115RR e M 7908 RR, previamente selecionados no experimento II), dois tratamentos de população de nematoides (0 e 7000 nematoides) e dois tratamentos de estresse hídrico (com e sem), cujas plantas foram avaliadas quanto a fenologia e produção de vagens e sementes, as raízes quanto à multiplicação de nematoides e as sementes quanto as determinações do grau de umidade, do potencial fisiológico (testes de germinação, tetrazólio, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, emergência de plântulas em areia e análise computadorizada de imagens de plântulas), ocorrência de sementes esverdeadas (método visual e fluorescência de clorofila) e citometria de fluxo. Com os resultados do experimento I, observou-se que a presença de *M. javanica* e de *P. brachyurus* em plantas de soja, independentemente da população inicial, provoca a redução do ciclo da planta devido exclusivamente à diminuição do estádio de senescência destas, porém a qualidade de sementes não foi afetada com população inicial de nematoides mais elevada (2400 espécimes). Todas as cultivares testadas no experimento II foram classificadas como suscetíveis, porém a cultivar TMG-115RR e M 7908 RR foram escolhidas para a condução do experimento III por permitirem boa reprodução dos nematoides em estudo e por serem consideradas por algumas empresas produtoras de sementes com sendo sensíveis a ocorrência de sementes esverdeadas. Finalmente, com os resultados do experimento III verificou-se que a população inicial de 7000 nematoides afeta, negativamente, a produção, a ocorrência de sementes esverdeadas e a qualidade de sementes. Entretanto, a intensidade do efeito de *M. javanica* e de *P. brachyurus* no desenvolvimento de plantas de soja, na ocorrência de sementes esverdeadas e no seu potencial fisiológico depende da população inicial e da espécie do nematoide, da cultivar e das condições ambientais as quais as plantas são submetidas.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*; *Pratylenchus brachyurus*; Fenologia; Senescência; Produção de sementes

ABSTRACT

Nematodes in soybean plants: relationship with the occurrence of green seeds and their physiological potential

Abiotic and biotic stresses in immature soybean plants, including nematodes presence, can result in premature plant death and can produce green seeds with low physiological potential. The aim of this study was to evaluate the *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus* presence on soybean plants and the relationship with plant development, the green seeds occurrence and the seed physiological potential. For this, three experiments were done. The experiment I was carried out using the cultivar Pintado, which was inoculated with different nematode population and the phenology, productivity, and the seed physiological potential were evaluated. In experiment II it was analyzed the resistance of ten soybean cultivars to *M. javanica* and *P. Brachyurus.* In experiment III plants of two soybean cultivars (TMG-115RR and M 7908 RR, chosen by experiment II) were submitted to two nematode population treatments (0 nematodes and 7000) and two levels of water stress (with and without) and they were evaluated as phenology and production of pods and seeds, the multiplication of nematodes on roots and the determinations of moisture content, physiological potential (germination, tetrazolium, accelerated aging, electrical conductivity, sand seedling emergence and seedling computerized image analysis), the occurrence of green seeds (visual method and chlorophyll fluorescence) and flow cytometry on seeds. It was observed in the results of experiment I that the *M. javanica* and *P. brachyurus* on soybean plants, regardless of the initial population, decreases of cycle plant due the decrease on senescence phase, however, the seed quality was unaffected with higher initial nematode population (2400 nematodes). All the cultivars in experiment II were classified as susceptible, but the cultivar TMG-115RR and M 7908 RR were chosen for the experiment III because they allowed a good nematode reproduction and because some seed companies considered them as sensible to soybean green seed occurrence. Finally, the results of experiment III showed that the initial population of 7000 nematodes affected negatively the production, the soybean green seeds occurrence and the seed quality. However, the effect of *M. javanica* and *P. brachyurus* in the soybean plantas development, in the soybean green seeds occurrence and their physiological potential depends on the initial nematode population and species, cultivar and environmental conditions which the plants are exposed.

Keywords: *Meloidogyne javanica*; *Pratylenchus brachyurus*; Phenology; Senescence; Seed production

1 INTRODUÇÃO

O potencial fisiológico de sementes de soja, particularmente nas regiões tropicais, pode ser influenciado por muitos fatores durante a maturação das sementes. Entre estes, incluem-se períodos secos, danos por insetos, doenças (o que inclui a presença de nematoide), temperaturas altas durante a maturação e flutuações nas condições ambientais.

A ocorrência dos referidos estresses em plantas imaturas de soja pode resultar em morte prematura ou maturação forçada proporcionando a ocorrência de sementes esverdeadas. Isso acontece, devido à degradação parcial da clorofila na semente durante a fase final da maturação, mantendo as sementes maduras esverdeadas, e tem causado preocupação aos produtores de sementes, pois este fenômeno acarreta prejuízos tanto na indústria de óleos comestíveis como para a produção de sementes, por estas serem de menor potencial fisiológico.

A presença de sementes esverdeadas de soja tem ocasionado descarte de muitos lotes devido ao decréscimo da qualidade pois afeta, significativamente, a viabilidade e o vigor destas, prejudicando o estabelecimento do estande, o que pode resultar em perdas de produtividade.

A ocorrência de seca e temperaturas acima da média histórica em diversas regiões produtoras dos Estados do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, do Paraná, do Mato Grosso do Sul, do Mato Grosso e de Goiás, ocasionou nas últimas safras, acentuadas perdas de produtividade e de ocorrência de sementes e de grãos esverdeados de soja. Além disso, sabe-se, também, que na maioria destes Estados houve aumento na incidência de nematoides. Portanto, a presença deste patógeno nos campos de produção de sementes de soja pode estar favorecendo o aumento da ocorrência de sementes esverdeadas e, consequentemente, diminuindo o potencial fisiológico destas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a presença de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne javanica* em plantas de soja e a relação com o desenvolvimento da planta, com a ocorrência de sementes esverdeadas e com o potencial fisiológico destas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Nematoides na cultura da soja

Entre os problemas fitossanitários da cultura da soja, os nematoides *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* estão entre os patógenos que mais causam danos a esta cultura (KOENNING et al., 1999; KIMATI et al., 2005; FERRAZ, 2006).

No caso das fitonematoses, a relação quantitativa entre os nematoides, o crescimento e a produção das culturas anuais como a soja, é primariamente função da densidade populacional e da época de semeadura (BARKER et al., 1985 apud ASMUS; FERRAZ, 2001). Porém, é valido destacar que além de outros fatores, o efeito do nematoide na produtividade depende da sua espécie e da cultivar.

De maneira geral, a interferência de nematoides no desenvolvimento de plantas hospedeiras relaciona-se à espoliação de nutrientes durante a sua alimentação, alteração na absorção e translocação de água e nutrientes, modificação ou destruição dos tecidos das raízes e diminuição do crescimento das mesmas (HUSSEY; WILLIAMSON, 1998). Tais eventos traduzem-se em várias respostas nas plantas parasitadas, resultando comumente, em amarelecimento, redução do porte e seca das plantas em casos extremos, identificados geralmente em formato de reboleiras no campo (Figura 1). Dessa forma, é de se esperar que a incapacidade das raízes danificadas em suprir a parte aérea das plantas com suficientes quantidades de água e nutrientes, particularmente nitrogênio, traduza-se em alterações no processo fotossintético (HUSSEY; WILLIAMSON, 1998).

O comprometimento do processo fotossintético provocado pela presença dos nematoides reduz também a produção de grãos e para a produção de sementes, pode afetar seriamente tanto o rendimento quanto a qualidade das sementes produzidas (COSTA et al., 2003).

Figura 1 - Sintoma severo da presença de nematóides: formação de reboleira em campo de produção de sementes de soja

2.1.1.1 *Meloidogyne javanica*

Dentre os nematoides do gênero *Meloidogyne*, *Meloidogyne javanica* é comum em campos de soja nos Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Bahia. A grande distribuição deste patógeno nas áreas produtoras de soja no Brasil aconteceu juntamente com a expansão das áreas de cultivo (DIAS; GARCIA; SILVA, 2000), pois a alta capacidade reprodutiva deste nematoide e o fato de ser uma espécie perfeitamente adaptada às condições brasileiras contribuíram para um rápido crescimento das populações no campo.

Além do Brasil, este nematoide tem apresentado grande importância em outros países. Sasser, Carter e Hartman (1984) afirmaram, em pesquisa conduzida pelo "*International Meloidogyne Project*" (IMP), que aproximadamente 95% dos nematoides parasitas de raízes que causam danos às plantas cultivadas são do gênero *Meloidogyne*.

O ciclo de vida de *Meloidogyne* inicia com a eclosão dos juvenis de segundo estádio (J2) dos ovos, os quais geralmente movem-se em nível intercelular após penetrarem na base do cilindro vascular, migrando para o córtex da planta através da ponta de raiz (WYSS; GRUNDLER; MUNCH, 1992). Os nematoides estabelecem um permanente local de alimentação e os juvenis iniciam, então, a formação de um sitio de alimentação, injetando secreções de suas glândulas esofagianas em células adjacentes à sua extremidade anterior, as quais são induzidas a divisão nuclear sem ocorrer a citocinese (separação das células). Este

processo gera grandes aglomerados celulares, chamados de células gigantes ou nutridoras (WEISCHER; BROWN, 2001). Da secreção (citoplasma) dessas células nutridoras alimentam-se as larvas durante todo o ciclo, a partir do momento em que penetram nas raízes (LORDELLO, 1988). Dessa forma, como este gênero de nematoides fica permanentemente nesses sítios de alimentação formados nas raízes, são, no geral, conhecidos como endoparasitas sedentários (WEISCHER; BROWN, 2001).

O nematoide juvenil, alimentando-se sobre as células nutridoras sofre ecdises e evolui para o estádio pré-adulto, de formato salsichoide. Nesta fase, a região posterior do pré-adulto feminino provoca o rompimento da rizoderme, ficando seu corpo parcialmente exposto para fora da raiz. Mais tarde, com a quarta ecdise a fêmea adquire um formato de "pera", continuando aderida as células gigantes (WEISCHER; BROWN, 2001).

Embora existam relatos de que ocorram cópulas entre os nematoides do gênero *Meloidogyne*, isso raramente ocorre. Sabe-se que os machos não são necessários, pois neste gênero de nematoides parasitas é comum a reprodução por meio de partenogênese, ou seja, sem a necessidade do macho (LORDELLO, 1988). Cada fêmea tem a capacidade de produzir aproximadamente 400-500 ovos, os quais são expelidos para o meio externo e acabam aglomerando-se em uma substância gelatinosa produzida pela fêmea, formando uma massa de ovos chamada de ooteca (WEISCHER; BROWN, 2001; LORDELLO, 1988; FERRAZ et al., 2010). Os J2 recém saídos dos ovos podem permanecer na mesma planta ou migrar para outras plantas (LORDELLO, 1988).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são conhecidos como sendo de galhas, pois a divisão e a expansão das células vegetais ao redor da zona de alimentação causam a formação das galhas (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996). Na parte aérea, o efeito normalmente é amarelecimento foliar de padrão internerval, redução do porte da planta e seca das mesmas caso o ataque seja muito severo.

Em um dos trabalhos realizados com o patossistema soja x *M. javanica*, o nível crítico de danos para a variedade UFV-1, em casa de vegetação, foi inferior a 2000 ovos + juvenis J2 por quilograma de solo e houve uma correlação negativa altamente significativa entre a população do nematoide, a época de plantio e as variáveis altura, massa de parte aérea, massa do sistema radicular e área foliar das plantas (SHARMA; RODRIGUÉZ, 1982). Em outro trabalho foi detectada a redução da massa seca de parte aérea de soja das cultivares UFV ITM1 e Cristalina, quando inoculadas com níveis populacionais da ordem de 9000 ovos por planta ou superiores (CARNEIRO; MAZZAFERA; FERRAZ, 1999). A incerteza da relação entre a intensidade da doença e a produção da planta pode ocorrer pelo fato da doença,

considerada isoladamente, apresentar impactos diversos sobre a produção em função da época de sua ocorrência na cultura, da ocorrência de desfolha causada pela própria doença ou, ainda, por ignorar-se a parte aérea sadia, fotossintetizante, verdadeiramente responsável pela produção (WAGGONER; BERGER, 1987).

Em outro estudo com as cultivares Embrapa 133 e Coodetec 201 foram observados reduções do índice de área foliar, da produção de massa seca total de parte aérea e da produção de grãos para as plantas inoculadas com densidade populacional igual ou superior a 1200 J2 de *M. javanica* por planta (ASMUS; FERRAZ, 2001).

A redução no índice de área foliar e na produção das plantas ocorre porque os nematoides de galhas utilizam rapidamente o carbono fixado nas folhas e consomem uma significativa parte do total de energia produzida pelas plantas (CARNEIRO; MAZZAFERA; FERRAZ, 1999; CARNEIRO, 2000; MELAKEBERHAN; FERRIS; DIAS, 1990). O grande tamanho e o elevado conteúdo protéico do corpo das fêmeas de *Meloidogyne* associados à alta capacidade de produção de ovos que apresentam e as modificações que causam na organização e na fisiologia das raízes, alteram o padrão energético das plantas, comprometendo-lhes a capacidade de manter e expandir certas estruturas como as folhas (ASMUS; FERRAZ, 2001). Dessa forma, com valores mais elevados de população inicial, deve ocorrer diminuição na produção de fotoassimilados em decorrência da menor área foliar fotossintetizante, associada ao efeito de dreno metabólico exercido pelo nematoide, resultando em sensível redução de massa fresca de planta (ASMUS; FERRAZ, 2001).

2.1.1.2 *Pratylenchus brachyurus*

Os nematoides das lesões radiculares pertencem ao gênero *Pratylenchus* e têm sido mundialmente reconhecidos. É um importante nematoide e está disseminado em regiões tropicais e subtropicais, causando grandes perdas em diversas culturas (FERRAZ, 1999; SILVA; PEREIRA, 2003; MOURA et al., 2004; GOULART, 2008; SEVERINO; DIAS-ARIEIRA; TESSMAN, 2010). Sendo assim, a espécie *Pratylenchus brachyurus* por ser sabidamente agressiva, polífaga e uma das mais disseminadas do gênero e tem sido importante para os cultivos de soja no Brasil (FERRAZ, 1995b, 2006).

Nos últimos anos, os nematoides das lesões radiculares têm causado danos elevados e crescentes, além de perdas econômicas muito preocupantes em diversas culturas em várias regiões do Brasil, especialmente na região do cerrado (centro-oeste) e principalmente nas culturas da soja (YONEYA, 2008), feijão, milho, algodão (SILVA et al., 2004; MACHADO et al., 2006) e pastagens.

Estes nematoides já se encontravam bem distribuídos em diversas regiões do Brasil, porém, recentemente com a intensificação dos cultivos (safrinha e safra irrigada), a sua importância econômica tem aumentado. As causas deste aumento ainda não estão esclarecidas, mas no caso de *Pratylenchus brachyurus* podem estar relacionadas com os seguintes fatores: ausência de rotação de culturas, cultivo contínuo de uma mesma espécie vegetal, principalmente monoculturas de soja, de algodão e de feijão, rotação ou sucessão com culturas que são boas hospedeiras dos nematoides e emprego do sistema de plantio direto ou cultivo mínimo (GOULART, 2008).

Os nematoides das lesões conservam a mobilidade e o formato esguio do corpo ao longo de toda a vida, por esta razão são conhecidos como nematoides migradores. A fase juvenil (J2) penetra as raízes e migra através da rizoderme até estabelecer-se próximo à endoderme. Em seguida, tem-se o desenvolvimento da fase adulta e a ovoposição, tudo no interior do tecido das raízes. Em média, cada fêmea produz de 80 a 150 ovos durante toda a vida e o tempo necessário para completar o ciclo de vida é de 3 a 4 semanas. Porém, esse tempo varia muito dependendo principalmente da temperatura, da umidade e da espécie da planta hospedeira (TIHOHOD, 1997; CASTILLO; VOVLAS, 2007 apud GOULART, 2008).

Juvenis e adultos permanecem na raiz durante todo o tempo ou podem migrar para o solo e buscar novas raízes para penetrar (WEISCHER; BROWN, 2001). Assim, os danos primários causados por esses nematoides são a destruição mecânica das células radiculares durante a migração, causando uma lesão necrótica (por esse motivo é conhecido como nematoide das lesões) e a redução no crescimento da planta pela injeção de secreções esofagianas tóxicas. Além disso, os prejuízos secundários resultam da invasão de microorganismos nos tecidos radiculares através das lesões provocadas pelos nematoides (WEISCHER; BROWN, 2001; FERRAZ, 2006).

Plantas de soja hospedeiras de *P. brachyurus*, mesmo sob condições favoráveis de crescimento podem sofrer reduções significativas nas massas de raiz e de parte aérea quando expostas a nível populacional inicial da ordem de um espécime por centímetro cúbico de solo (FERRAZ, 1995a). No campo, danos expressivos poderão ser mais altos desde que o tipo de solo seja propício ao desenvolvimento deste nematoide, pois fatores climáticos e outros problemas fitossanitários comumente agravam os efeitos da ação dos nematoides. No Brasil, há relatos freqüentes de reduções de até 30% na produção de soja em áreas infestadas com *P. brachyurus* em lavouras comerciais na região Centro-Oeste (BASTOS et al., 2007).

Conforme trabalho realizado por Silva et al. (2004), *P. brachyurus* é o nematóide mais distribuído nas áreas algodoeiras do Estado do Mato Grosso, ocorrendo em 94% das 623

amostras coletadas em 18 municípios, representando 21.793 ha. No Mato Grosso do Sul, em levantamento feito por Asmus (2004), também foi constatado expressiva presença de *P. brachyurus* (82, 79 e 87% de freqüência nas cidades de Chapadão do Sul, Costa Rica e São Gabriel do Oeste, respectivamente). Em Goiás, de 237 amostras de solo coletadas em 10 municípios, foi encontrado *P. brachyurus* em todos os municípios e em 79% das amostras (GIELFI; SANTOS; ATHAYDE, 2003).

A elevada ocorrência de *P. brachyurus* pode estar associada à dispersão junto com partículas de solo aderidas a implementos agrícolas, estabelecendo-se com sucesso em novas áreas graças ao seu caráter polífago (FERRAZ, 1999) e ao favorecimento por mudanças ocorridas no sistema de produção, como a adoção do sistema de plantio direto e da irrigação (INOMOTO et al., 2006).

2.1.2 Sementes esverdeadas de soja e potencial fisiológico

2.1.2.1 Sementes esverdeadas de soja

A qualidade de sementes de soja, principalmente nas regiões tropicais, pode ser influenciada por diversos fatores que ocorrem durante todas as etapas de produção. Durante a maturação de sementes, as plantas estão sujeitas a uma série de estresses abióticos e bióticos (o que inclui o parasitismo por nematoides), o que pode resultar em morte prematura ou maturação forçada da planta e produção de sementes ou grãos esverdeados (FRANÇA NETO et al., 2005).

Sob circunstâncias normais, para a maioria das espécies agrícolas, a quantidade de clorofila decresce durante a maturação, ao mesmo tempo que a cor da semente muda de verde para a cor característica da espécie ou cultivar; esse processo é conhecido como "*degreening*" (WARD et al., 1995; JALINK et al., 1998a). Neste processo, a enzima clorofilase degrada a clorofila presente nas sementes de soja, proporcionando o aparecimento da coloração amarela da semente, que é um dos indicativos de que a mesma atingiu a maturidade fisiológica (FRANÇA NETO et al., 2005). Porém, em condições de estresse excessivo durante os últimos estádios de maturação da semente, a secagem e o desenvolvimento das mesmas ocorrem de forma rápida, podendo haver a interrupção da atividade da enzima antes que toda a clorofila tenha sido degradada (BOHNER, 2003).

A ocorrência de sementes esverdeadas em um lote é variável, em função do tipo, da intensidade e de quando ocorre o estresse que resulta na morte prematura ou na maturação forçada da planta. Além disso, depende também da suscetibilidade genética da cultivar ou da característica genética desta de manter a clorofila retida no tegumento, mesmo quando a

semente está madura (WARD et al., 1995; FRANÇA NETO et al., 2005). Pádua et al. (2009a) confirmaram que as cultivares MG/BR 46 (Conquista) e a BRS 251 (Robusta) são mais suscetíveis à produção de sementes esverdeadas quando submetidas a estresses de alta temperatura e de deficiência hídrica, em relação às cultivares BRS133 e CD206.

Estresses ambientais, como altas temperaturas e períodos de seca durante a maturação, interferindo na degradação da molécula de clorofila e resultando em aumento na ocorrência de sementes esverdeadas têm sido destacado por diversos autores (DORNBOS; MULLEN, 1991; BOHNER, 2003; PÁDUA et al., 2009a, 2009b, FRANÇA NETO, 2005, 2012). Isso ocorre devido à translocação muito rápida das reservas e às menores taxas de fotossíntese, que impedem a degradação completa da clorofila, resultando na produção de sementes esverdeadas e de baixa qualidade (MARCOS FILHO, 2005).

Para testar o efeito de temperatura e estresse hídrico, Pádua et al. (2009b) trabalharam com plantas de soja da cultivar CD 206 submetidas a diferentes condições de estresse térmico, com temperaturas elevadas (28 ºC a 36 ºC) e amena (19 ºC a 26 ºC) e déficit hídrico (sem restrição; 30% de umidade gravimétrica (UG); 20% de UG e sem água) em condições de fitotron a partir de R_6 e R_7, e constataram que o estresse hídrico intenso associado a altas temperaturas em R_6 resultou em elevados percentuais de sementes esverdeadas. Neste mesmo trabalho, foi verificado que praticamente não houve ocorrência de sementes esverdeadas nas condições da testemunha e de 30% de UG. Porcentagem média de 5% foi observada nas plantas submetidas a 20% de UG. No entanto, sem água ou corte total de irrigação, houve acentuada incidência de semente esverdeadas, com porcentagem de ocorrência de 43%.

França Neto et al. (2005) destacaram que algumas doenças de raiz, como fusarioses, de colmo, como o cancro da haste, e de folhas, como a ferrugem asiática, o intenso ataque de insetos, principalmente percevejos sugadores durante as fases finais de enchimento de grãos e de maturação, podem resultar em morte prematura da planta e ocasionar sementes esverdeadas.

Nesta mesma linha, a presença de nematoides pode exercer o mesmo efeito estressante na planta e favorecer a ocorrência de sementes esverdeadas. Porém, ainda não existe nenhum estudo relacionando o possível efeito desta interação com a ocorrência de sementes esverdeadas e com a redução do potencial fisiológico das sementes.

Outra prática que pode resultar neste problema é a dessecação das plantas antes da maturidade fisiológica (MARCOS FILHO, 2005). Adams, Fjerstad e Rinne (1983) estudando soja, observaram em campo que quando a colheita foi realizada em condições de alta temperatura e baixa umidade relativa do ar, com rápida perda de umidade, ou quando foram

aplicados produtos químicos dessecantes na cultura para acelerar o amadurecimento, houve a ocorrência de sementes esverdeadas.

Apesar de existir trabalho demonstrando que não existe relação do ciclo da cultura com a ocorrência de sementes esverdeadas de canola e nabo (WARD et al., 1995), sabe-se que a degradação de clorofila é dependente do teor de água presente nas sementes, como verificado em canola, cuja degradação da clorofila ocorreu rapidamente quando o teor de água foi de 65-35%, enquanto que abaixo deste valor o metabolismo foi interrompido (JOHNSON-FLANAGAN; SPENCER, 1996) ou se tornou muito lento (WARD et al., 1995). Assim, com a antecipação da senescência das plantas de soja o teor de água nas sementes também é reduzido mais rapidamente e, consequentemente, a degradação da clorofila vai cessar antecipadamente, mantendo as sementes esverdeadas após a maturação.

2.1.2.2 Potencial fisiológico de sementes esverdeadas de soja

Alguns trabalhos têm destacado que a presença de sementes esverdeadas em lotes de semente de soja tem contribuído para a redução do potencial fisiológico destas (MEDINA et al., 1997; COSTA et al., 2001; BOHNER, 2003; PUPIM et al., 2005; PÁDUA et al., 2005, 2007; ZORATO et al., 2007; FRANÇA NETO et al., 2012).

A redução no potencial fisiológico de sementes ocorre porque a taxa de deterioração avançada das sementes esverdeadas resulta em plântulas anormais, desuniformidade no tamanho das plântulas e pior desenvolvimento do sistema radicular, em comparação com as sementes nas quais houve degradação adequada da clorofila. A menor integridade das membranas das sementes que degradaram parcialmente a clorofila pode ser constatada pelo teste de condutividade elétrica (ZORATO et al., 2007); a alta lixiviação de solutos é atribuída ao rompimento das membranas celulares e estruturas internas, ocasionada pela secagem rápida, liberando grande quantidade de fosfato inorgânico, açúcares e proteínas solúveis que são lixiviados durante a embebição (ADAMS; FJERSTAD; RINNE, 1983).

Em muitos casos, ainda existe a possibilidade de que sementes esverdeadas recém-colhidas possam vir a germinar e produzir plântulas normais, porém não vigorosas. Entretanto, após três a quatro meses de armazenagem em condições não climatizadas, essas sementes perderão a sua viabilidade (FRANÇA NETO et al., 2012). Assim, a presença de clorofila não degradada nas sementes de soja está associada à menor longevidade, ou seja, as sementes perdem seu potencial fisiológico com o passar do tempo durante o armazenamento (ZORATO; WATANABE, 2006).

Em estudo com sementes de soja dos cultivares Tucunaré e Coodetec 206, com diversas porcentagens de sementes esverdeadas (0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% e 100%) foi verificado que os índices de deterioração por umidade, detectados pelo teste de tetrazólio, estavam diretamente relacionados com os índices de sementes esverdeadas e constatou-se que lotes de sementes de soja que apresentam ocorrência de sementes esverdeadas maior que 9% não devem ser utilizados para a semeadura, devido o comprometimento do potencial fisiológico destes (PÁDUA et al., 2007).

Em outro estudo, ao utilizar lotes com 100% de sementes esverdeadas de soja, Bohner (2003) constatou redução drástica no vigor das mesmas em comparação com 100% de sementes amarelas; foi verificado que o potencial fisiológico das sementes foi pouco afetado quando os lotes apresentaram 5 a 10% de sementes esverdeadas. Da mesma forma, em trabalho com sementes de soja da cultivar MG/BR46-Conquista, utilizando lotes com 11,8% e 37,4% de sementes esverdeadas, foi verificado por meio dos testes de germinação e vigor, que no lote com maior quantidade de sementes esverdeadas o potencial fisiológico das sementes foi mais baixo, podendo-se inferir que a presença de clorofila não degradada em sementes de soja é um indicativo de redução de potencial fisiológico (ZORATO et al., 2007).

Outros pesquisadores estudaram a intensidade da fluorescência de clorofila em sementes como sendo um indicativo da ocorrência de sementes esverdeadas. Jalink et al. (1998b) relataram que existe uma relação inversa entre a magnitude da fluorescência de clorofila e o potencial fisiológico das sementes de repolho (*Brassica oleracea*). Com esses dados, propuseram a fluorescência da clorofila do tegumento de sementes como um método não destrutivo para a determinação da maturidade e da qualidade das sementes. Os autores explanaram sobre as vantagens do método por expressar alta sensibilidade, não destruir a semente, pela rapidez com que a fluorescência é avaliada e pela especificidade por um único elemento, a clorofila. Outros pigmentos ou substâncias podem alterar a coloração da semente, mas não apresentam a emissão da fluorescência no comprimento de onda de excitação e emissão da clorofila.

Utilizando a mesma técnica de fluorescência de clorofila para a separação de sementes esverdeadas, Cicero, van Schoor e Jalink (2009) trabalharam com lotes de sementes de soja da cultivar TMG 133 RR com 0%, 5%, 10% 15% e 20% de sementes esverdeadas, avaliadas visualmente, e comprovaram a eficiência da técnica demonstrando que é possível aumentar a qualidade de lotes de sementes de soja pela remoção de sementes esverdeadas.

2.2 Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Análise de Sementes e de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal e no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP, no "Plant Research International (PRI)" em Wageningen, Holanda e na "University of Technology and Life Science" em Bydgosczc, Polônia.

Foram realizados três experimentos; para todos estes, a obtenção do inóculo foi realizada da forma descrita a seguir.

2.2.1 Obtenção do inóculo

As populações de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne javanica* utilizadas em todos os experimentos foram obtidas a partir de plantas de tomate ou soja e de sorgo, respectivamente, para cada espécie de nematóide.

A população de *Meloidogyne javanica* foi obtida de raízes de soja em Júlio de Castilhos (RS) e mantidas em casa de vegetação alternadamente em plantas de tomate e soja. Para a extração, as massas de ovos presentes nas raízes de tomateiro ou de soja foram inicialmente submetidas à coloração com Floxina B por 20 minutos e depois extraídas e colocadas sobre uma tela em contato com água. Estes ovos foram mantidos em câmara BOD a 20 ^{o}C por 24 horas para a eclosão. Após esse período foi obtida uma suspensão aquosa contendo J2 (juvenil fase 2) do nematoide.

Para *Pratylenchus brachyurus,* a população foi obtida de raízes coletadas em Sapezal (MT) e mantidas em plantas de sorgo. Os nematoides foram extraídos das raízes pelo método de Bearmann modificado para recipiente raso (HOOPER, 1986). As raízes foram processadas e trituradas em liquidificador e a suspensão resultante foi vertida em peneiras de 60 e 500 "mesh", respectivamente. O material presente na peneira de 500 "mesh" foi recolhido e depositado em recipiente raso, contendo peneira e papel toalha e mantido durante 48 horas em câmara BOD com temperatura constante de 28 ºC. Após esse período, a suspensão de nematoides contendo adultos e juvenis foi recolhida para ser posteriormente utilizada como inóculo.

2.2.2 Experimento I

Foi realizado no período de outubro de 2010 a maio de 2011, com o intuito de verificar qual população de nematoide poderia interferir no desenvolvimento das plantas, produção e qualidade de sementes. Assim, os resultados obtidos neste experimento foram importantes para o adequado planejamento do experimento III.

Foram utilizadas plantas da cultivar Pintado, as quais foram submetidas a diferentes populações de inóculo iniciais, sendo estes, 0, 300, 450, 600, 1200 e 2400 nematoides por recipiente por planta, para *P. brachyurus* e 0, 150, 300, 600, 1200 e 2400 nematoides por recipiente por planta, para *M. javanica.* Para cada tratamento, foram utilizadas 5 repetições, cada uma composta de duas plantas, totalizando 10 plantas por tratamento.

Optou-se por utilizar a cultivar Pintado para este experimento por essa ser considerada como padrão de suscetibilidade para ambos os nematoides (INOMOTO et al., 2006; MACHADO; INOMOTO, 2001; MACHADO et al., 2007; INOMOTO; ASMUS, 2010), e permitir uma boa multiplicação dos nematoides durante o ciclo da cultura.

Para a obtenção das plantas, a semeadura foi realizada em vasos de barro de volume de 2,0 litros, contendo substrato previamente autoclavado (66,5% areia, 8,4% silte e 25,1% de argila). Após 14 dias da semeadura, cada planta foi inoculada com as suspensões contendo os nematóides.

Após a preparação dos inóculos (da forma descrita no item 2.2.1.), foram feitos dois orifícios no substrato, próximo ao hipocótilo das plantas, um de 2 cm e outro de 4 cm de profundidade. Em cada orifício foi colocada a mesma quantidade de suspensão, previamente calibrada, perfazendo as populações iniciais (P_i) referentes aos tratamentos descritos anteriormente. Posteriormente, os orifícios foram cobertos com vermiculita.

Durante o desenvolvimento das plantas, os tratos culturais foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura e estes vasos foram mantidos em casa de vegetação desde a semeadura até a colheita das sementes.

Foram realizadas durante o desenvolvimento das plantas, avaliações de crescimento, florescimento e frutificação, para determinar o estádio fenológico de cada planta. Finalmente, foram avaliados o número de vagens por planta, número de sementes por planta, massa de matéria seca de sementes, massa de 100 sementes e massa de matéria seca de parte aérea. Também foi realizada determinação do grau de umidade das sementes, algumas determinações de potencial fisiológico (germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica) e a determinação de sementes esverdeadas pelo método visual da forma descrita a seguir.

2.2.2.1 Avaliação da fenologia

Foi realizado desde a semeadura até a colheita das sementes. A cada intervalo de dois dias foi avaliada a fenologia de cada planta e determinado principalmente o início e o final dos estádios vegetativo (V_E-V_n), florescimento e formação das vagens (R_1-R_4), enchimento das vagens ($R_{5.1}$-$R_{5.5}$), vagens cheias e senescência (R_6-$R_{8.3}$). A escala fenológica adotada foi a proposta por Fehr e Caviness (1977). A determinação do estádio fenológico de cada tratamento foi realizada considerando a data média de mudança de todas as plantas do tratamento.

2.2.2.2 Massa de matéria seca de sementes

Após a colheita, foi determinada a massa total de sementes por planta, a qual foi corrigida com base no teor de água das sementes. O resultado foi expresso como sendo a média das repetições da massa de matéria seca de sementes para cada tratamento.

2.2.2.3 Massa de 100 sementes

De forma semelhante à massa de matéria seca de sementes, foram feitas as contagens de 100 sementes para cada repetição, as quais foram pesadas e corrigidas com base no teor de água. O resultado foi expresso na média das repetições da massa de 100 sementes para cada tratamento.

2.2.2.4 Massa de matéria seca de parte aérea

Foi realizado utilizando a soma da massa seca de vagens (após a operação da trilha), hastes e ramos. Após a colheita e trilha, os tecidos das plantas foram levados a estufa regulada a 70 ºC por um período de 48 horas e, depois de secas, foram pesadas em balança analítica com duas casas decimais.

2.2.2.5 Grau de umidade

Foi utilizado o método da estufa, a 105 ^{o}C, com duas repetições de cada tratamento, conforme a metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

2.2.2.6 Teste de germinação

Cinco repetições de 40 sementes de cada tratamento foram distribuídas em papel toalha, marca Germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a sua massa. Os rolos depois de preparados foram mantidos em germinador regulado a 25 ^{o}C e as avaliações foram efetuadas no quinto e no oitavo dia após a instalação do teste, de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

2.2.2.7 Teste de envelhecimento acelerado

O teste de envelhecimento acelerado foi conduzido com cinco repetições de 40 sementes para cada tratamento. Uma camada de sementes única e uniforme foi colocada em caixas

plásticas tipo “gerbox” sobre uma tela, contendo 40 mL de água. Essas caixas foram mantidas tampadas em câmaras de envelhecimento sob 41 ^{o}C durante 48 horas, conforme recomendações de Marcos Filho (1999).

Após esse período, as sementes envelhecidas foram colocadas para germinar da mesma maneira descrita para o teste de germinação. A avaliação foi realizada ao quinto dia após a instalação do teste, computando-se a porcentagem de plântulas normais, segundo os critérios estabelecidos pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

2.2.2.8 Teste de condutividade elétrica

Foram utilizadas cinco repetições de 25 sementes para cada tratamento. Após a pesagem, as amostras foram submersas em 75 mL de água destilada, no interior de copos de plástico e, a seguir, mantidas por 24 horas em câmara regulada a temperatura de 25 ^{o}C (CUSTÓDIO; MARCOS FILHO, 1997). Ao final desse período, foram realizadas as leituras de condutividade elétrica da solução as quais as sementes foram submersas, expressando-se os resultados em $\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$ de sementes.

2.2.2.9 Determinação de sementes esverdeadas - método visual

Foram utilizadas cinco repetições de 40 sementes cada, as quais foram analisadas externamente ou seccionadas de forma a visualizar possíveis tons de verde no seu interior, determinando-se a porcentagem de sementes com coloração esverdeada.

Após a colheita das sementes, em cada um dos vasos, os nematoides foram extraídos das raízes pelo método do liquidificador, peneiramento e centrifugação com caulim (COOLEN; D’HERDE, 1972). Para isso, após a coleta das raízes, essas foram lavadas em água corrente até que todas as partículas de solo aderidas às raízes fossem removidas.

Feito isso, as raízes foram lavadas, pesadas em balança analítica e cortadas. Após, uma alíquota de 10 gramas de cada raiz foi processada com água (para *P. brachyurus*) e com solução aquosa de 0,5 % de hipoclorito de sódio (para *M. javanica*) em liquidificador por 1 minuto e a solução resultante foi vertida em peneiras 60 “mesh” e 500 “mesh”. O material retido na peneira de 500 “mesh” foi centrifugado com caulim por 5 minutos a uma rotação de 1800 rpm (aproximadamente 580g). Feito isso, eliminou-se o sobrenadante, adicionou-se solução de sacarose (densidade de 1,15) e ressuspendeu-se o sedimento do fundo formando uma suspensão, a qual foi novamente centrifugada por 1 minuto a uma rotação de 1800 rpm (aproximadamente 580 g). Em seguida, verteu-se o sobrenadante sobre a peneira de 500 “mesh”, lavando-a em seguida para eliminar resíduos da solução açucarada. Com o auxílio de

uma pisseta, recuperou-se o material retido na peneira com água e transferiu para recipiente de vidro para a posterior análise.

No final do processo, os nematoides foram mortos por aquecimento, em banho-maria, a temperatura máxima de 55 ºC e conservados em formol (aproximadamente 2%). O número de nematoides e ovos final (P_f) foi estimado pela contagem em lâmina de Peters, com o auxílio de microscópio ótico. A partir da P_f, calculou-se o crescimento populacional, por meio da média do fator de reprodução ($FR=P_f/P_i$) para os respectivos tratamentos (OOSTENBRINK, 1996).

2.2.3 Experimento II

Foi realizado um experimento, no período de junho a agosto de 2011, com o objetivo de caracterizar a reação de cultivares de soja aos nematoides *P. brachyurus* e *M. javanica* com potencial para serem utilizados no terceiro experimento. Foram testados os cultivares TMG 115 RR, M 7908 RR, TMG 131 RR, Tucunaré, M 8867 RR, M 8866, Tabarana, TMG 801, TMG 103 RR e Pintado, sendo os três primeiros considerados por algumas empresas produtoras de sementes como sendo mais sensíveis a ocorrência de sementes esverdeadas e o Pintado considerado como sendo o padrão de suscetibilidade aos nematoides.

As sementes foram inicialmente semeadas em papel de germinação; cinco dias após a semeadura, cinco plântulas foram transplantadas para sacos de plástico preto de volume de 500 cm^3 contendo solo autoclavado (77,9% de areia, 4,1% de silte e 18,1% de argila). Nove dias após o transplante, efetuou-se a inoculação, obtendo-se o inóculo de acordo com o descrito no item 2.2.1. A inoculação foi realizada pela pipetagem de suspensão de 300 espécimes em dois orifícios de 2 e 4 centímetros de profundidade localizados próximo ao colo das plantas.

Após 90 dias, as raízes foram lavadas, secas e processadas pelo método de liquidificador, peneiramento e centrifugação com caulim (COOLEN; D'HERDE, 1972), para a obtenção da população final de cada um dos nematoides. Após contagem em lâmina de Peters, o fator de reprodução foi estimado para cada repetição e foi determinada a média das cindo repetições. Não foi realizada a extração de nematoides do solo, pois a população final do solo geralmente é muito baixa quando comparada à das raízes, o que geralmente não influencia na classificação de plantas como sendo resistentes ou suscetíveis.

A cultivar foi considerado suscetível quando o fator de reprodução foi superior a 1, ou seja, quando foi verificado a multiplicação do nematoide.

2.2.4 Experimento III

A condução das plantas na casa de vegetação foi realizada no período de novembro de 2011 a abril de 2012 e foram utilizados os cultivares TMG-115RR e M7908 RR, classificados no experimento II como suscetíveis e com alta capacidade de multiplicação de *M. javanica* e *P. brachyurus*.

Como no experimento I, não foi verificado efeito das populações de nematoides testadas na produção das plantas e na qualidade de sementes, optou-se em utilizar no segundo experimento plantas sem nematoides e uma população de 7000 nematoides, sendo esta aproximadamente três vezes mais elevada que a maior população que tinha sido utilizada no primeiro experimento. Além disso, para os dois tratamentos de população de nematoides foram conduzidas plantas com e sem estresse hídrico. Isso foi feito porque observações de campo mostraram que grandes perdas de produção e interferência do desenvolvimento das plantas podem ocorrer em lavouras sob situações que favoreçam o parasitismo (FERRAZ, 2001).

Desta forma, para cada nematoide e cada cultivar foram considerados quatro tratamentos: sem nematoides e sem estresse hídrico, sem nematoides e com estresse hídrico, com nematoides e sem estresse hídrico e com nematoides e com estresse hídrico.

Para cada tratamento, foram realizadas 4 repetições, cada uma composta de 4 plantas, totalizando 16 plantas por tratamento.

Para a obtenção das plantas, a semeadura foi realizada em rolos de papel os quais foram mantidos em câmara a 25 ^{o}C para a germinação. Após quatro dias, o transplante foi realizado em vasos de plástico preto de volume de 1,7 litros, contendo substrato previamente autoclavado (75,2% areia, 3,4% silte e 21,4% de argila). Dez dias após o transplante, as plantas dos tratamentos com nematoides foram inoculadas com as suspensões contendo 7000 nematoides. Para isso foram feitos dois orifícios no substrato, próximo ao hipocótilo, um de 2 cm e outro de 4 cm de profundidade. Em cada orifício foi colocada a mesma quantidade de suspensão, previamente calibrada, perfazendo a população inicial (P_i) desejada. Posteriormente, os orifícios foram cobertos com vermiculita.

Durante a condução das plantas, os tratos culturais foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura e estes vasos foram mantidos em casa de vegetação desde a semeadura até a colheita das sementes.

Para os tratamentos com estresse hídrico, a disponibilidade hídrica nas plantas foi controlada em dois momentos do desenvolvimento: no início do enchimento das vagens, em $R_{5.1}$ e $R_{5.2,}$ e no início da senescência, em $R_{7.1,}$ até o final do ciclo da planta. Esses dois pontos

de indução de estresse foram determinados pois, após a fase vegetativa, o grande volume de raízes formado permite o aumento intenso da população de nematoides, de forma que, havendo na sequência do ciclo da cultura a ocorrência de estresse hídrico, efeitos drásticos poderão ser verificados pela presença dos nematoides (FERRAZ, 2001). Além disso, Dornbos e McDonald (1986) relataram que o período de acúmulo de reservas em sementes de soja é crítico e este ocorre entre os estádios de R_5 e R_7.

Para a ocorrência do estresse hídrico durante os estádios de $R_{5.1}$ e $R_{5.2}$, as plantas foram irrigadas com água equivalente a 10% da umidade gravimétrica do solo (disponibilidade de 270 mL de água por vaso de 1,7 L por dia) e durante os estádios de $R_{7.1}$ até o final do ciclo com água equivalente a 3,3% da umidade gravimétrica do solo (disponibilidade de 90 mL de água por vaso de 1,7 L por dia). Durante os outros estádios de desenvolvimento, as plantas foram mantidas com disponibilidade plena de água durante todo o dia. A umidade gravimétrica do solo foi determinada baseada na relação entre a massa de água em uma amostra de solo e a massa do solo seco da mesma amostra (CLAESSEN, 1997).

Foram realizadas durante o desenvolvimento das plantas, avaliações de crescimento, florescimento e frutificação para determinar o estádio fenológico de cada planta da mesma forma descrita no item 2.2.2.1.. A escala fenológica adotada foi a proposta por Fehr e Caviness (1977).

Após a colheita das sementes, em cada um dos vasos, os nematoides foram extraídos de alíquotas de 10 g de raízes, pelo método do liquidificador, peneiramento e centrifugação com caulim (COOLEN; D'HERDE, 1972), após lavagem, secagem em papel absorvente e pesagem da massa total de raízes. No final do processo, os nematoides foram mortos por aquecimento, em banho-maria, à temperatura máxima de 55º C e conservados em formol. O número de nematoides e ovos final (P_f) foi estimado pela contagem em lâmina de Peters, com o auxílio de microscópio ótico. A partir da P_f, calculou-se o crescimento populacional, por meio da média do fator de reprodução ($FR=P_f/P_i$) para os respectivos tratamentos (OOSTENBRINK, 1996).

Para as sementes colhidas, foram determinados a massa de matéria seca de sementes, a massa de 100 sementes, a massa de matéria seca de parte aérea e o grau de umidade da mesma forma descrita nos itens 2.2.2.2. a 2.2.2.5. Para a determinação da qualidade de sementes foram realizadas as avaliações do potencial fisiológico (testes de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica) e avaliações da ocorrência de sementes esverdeadas pelo método visual de acordo com os itens 2.2.2.6. a 2.2.2.9.. Para complementar os resultados de qualidade de sementes e de ocorrência de sementes esverdeadas foram realizadas avaliações

de tetrazólio, emergência de plântulas em areia, análise computadorizada de plântulas, presença de clorofila por meio da fluorescência de clorofila e do ciclo celular por meio da citometria de fluxo da forma descrita a seguir.

2.2.4.1 Teste de tetrazólio

Foram utilizadas 100 sementes de cada tratamento divididas em 4 subamostras de 25 sementes cada. Essas inicialmente foram pré condicionadas em papel-toalha "germitest" umedecido, durante 14-16 horas, em germinador a 25º C. Decorrido esse período, as sementes foram transferidas para copinhos de plástico contendo solução de tetrazólio a 0,075%, onde permaneceram durante aproximadamente 120 minutos em estufa a 40 ºC, no escuro. Após o desenvolvimento da coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e mantidas submersas em água, em um refrigerador até o momento da avaliação. As avaliações foram realizadas seguindo os critérios estabelecidos por França Neto; Krzyzanowski e Costa (1998), levando em consideração a viabilidade, o vigor e a ocorrência de danos ou anomalias embrionárias.

2.2.4.2 Teste de emergência de plântulas em areia

O teste foi conduzido em bandejas contendo areia como substrato onde foram distribuídas quatro repetições de 100 sementes para cada tratamento. Quatorze dias após a semeadura, foi realizada a contagem das plântulas, obtendo os resultados expressos em porcentagem de emergência de plântulas.

2.2.4.3 Análise computadorizada de imagens de plântulas

As plântulas foram obtidas de quatro repetições de 25 sementes, as quais foram colocadas para germinar em duas fileiras situadas no terço superior da superfície do papel toalha, a 25 ^{o}C, durante três dias. Em seguida, as imagens foram captadas em *scanner* HP Scanjet 2004, montado de maneira invertida no interior de uma caixa de alumínio com 60 cm x 50 cm x 12 cm e operado por *software* Photosmart, com resolução de 98 dpi. As plântulas normais identificadas em cada repetição foram transferidas do papel-toalha para uma folha de cartolina de coloração preta com 30cm x 22cm (correspondente ao tamanho da área útil atingida pelo *scanner*) e as imagens escaneadas foram analisadas pelo *software* Seed Vigor Imaging System (SVIS®). Após o processamento das imagens, foram obtidos valores médios do índice de vigor, de uniformidade, de crescimento e o comprimento de plântulas para cada tratamento (HOFFMASTER et al., 2005; MARCOS FILHO; KIKUTI; LIMA, 2009).

2.2.4.4 Fluorescência de clorofila

Este teste foi realizado no Plant Research International (PRI) em Wageningen, Holanda. Com a utilização da técnica de fluorescência de clorofila, foi possível observar

diferenças relativas na quantidade deste pigmento em sementes individuais ou nos tratamentos de sementes (JALINK et al., 1999); baseado na intensidade de fluorescência, foi possível separá-las em várias classes de acordo com a quantidade de clorofila.

Para determinação da fluorescência de clorofila das sementes, foi utilizado o equipamento "CF Seed Sorter & Analyser", modelo JS-2001. A técnica consiste em um sistema de excitação por laser e detecção da fluorescência da clorofila por meio de um fotodiodo; é um método não destrutivo e automatizado para a determinação da qualidade de sementes, sendo as mesmas avaliadas individualmente. O equipamento é composto por um laser de diodo que emite luz na faixa de comprimento de onda de 670 nm (Hewlett Packard HLMP – 8150), comprimento de absorção de energia pela molécula de clorofila *a*. Uma parte desta energia é absorvida pela semente, enquanto que, a energia excedente é dissipada na forma de radiação, com energia menor do que a incidida e, consequentemente, maior comprimento de onda, que é detectado por um fotodiodo com um filtro óptico de interferência centrado no comprimento de 730 nm, que permite a detecção apenas da fluorescência proveniente da clorofila *a*. O amplificador "lock-in" (Stanford Research SR 830, USA) é modulado na freqüência de 177 Hz e permite a amplificação do sinal de fluorescência. Por meio de um programa computacional, os valores de fluorescência de clorofila são registrados, em pA, e construídos histogramas para averiguação da confiabilidade dos resultados.

A seguir, as sementes que compõe um tratamento foram separadas em quatro classes de fluorescência de clorofila: 0 a 400 pA, 400 a 800 pA, 800 a 1200 pA e acima de 1200 pA. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes em cada classe de fluorescência de clorofila.

2.2.4.5 Citometria de fluxo

Este teste foi realizado na University of Technology and Life Science em Bydgoszcz, Polônia. O mesmo foi proposto com o intuito de detectar diferenças mínimas que não foram possíveis de serem avaliadas pelos testes de potencial fisiológico em alguns casos. Entre as determinações, a citometria de fluxo permite avaliar o ciclo celular nas sementes.

As amostras de núcleos para a análise por meio da citometria de fluxo foram preparadas de acordo com o procedimento proposto por Lanteri et al. (1993). Para isso, foram utilizadas 10 sementes secas e embebidas por 24 horas para cada tratamento e estas foram dissecadas em eixo embrionário e cotilédones para avaliação separada de cada parte da semente. Após a separação, para obtenção e isolamento dos núcleos celulares, cada tecido foi triturado com uma lâmina de aço em 1 ml de solução tampão de isolamento nuclear (0,1 M Tris-Cl, 2,5 mM $MgCl_2$, $6H_20$, 85mM NaCl, 0,1% v/v Triton X-100, pH7,0), suplementado

com 4',6-diamidino-2-fenilindol - DAPI 2µg/ml (para detecção do DNA) + 2% PVP. A solução resultante deste procedimento foi posteriormente filtrada em filtro de naílon ("mesh" de 30-50 µm) diretamente em um tudo de ensaio e analisada por meio do citômetro de fluxo, modelo Partec CCA (Muster, Alemanha). Para cada amostra foram analisados no mínimo 7000 núcleos.

Pela comparação do conteúdo de DNA nuclear de sementes secas e embebidas, foi possível obter informações da relação entre a porcentagem de células em divisão e a eficiência do processo de germinação (LANTERI et al., 1993). Assim, sementes embebidas que apresentem maior quantidade de células em divisão ou já divididas seriam sementes que tiveram seus mecanismos de reparo para a germinação mais rapidamente estabelecido, demonstrando maior capacidade e velocidade de produzir plântulas normais e vigorosas.

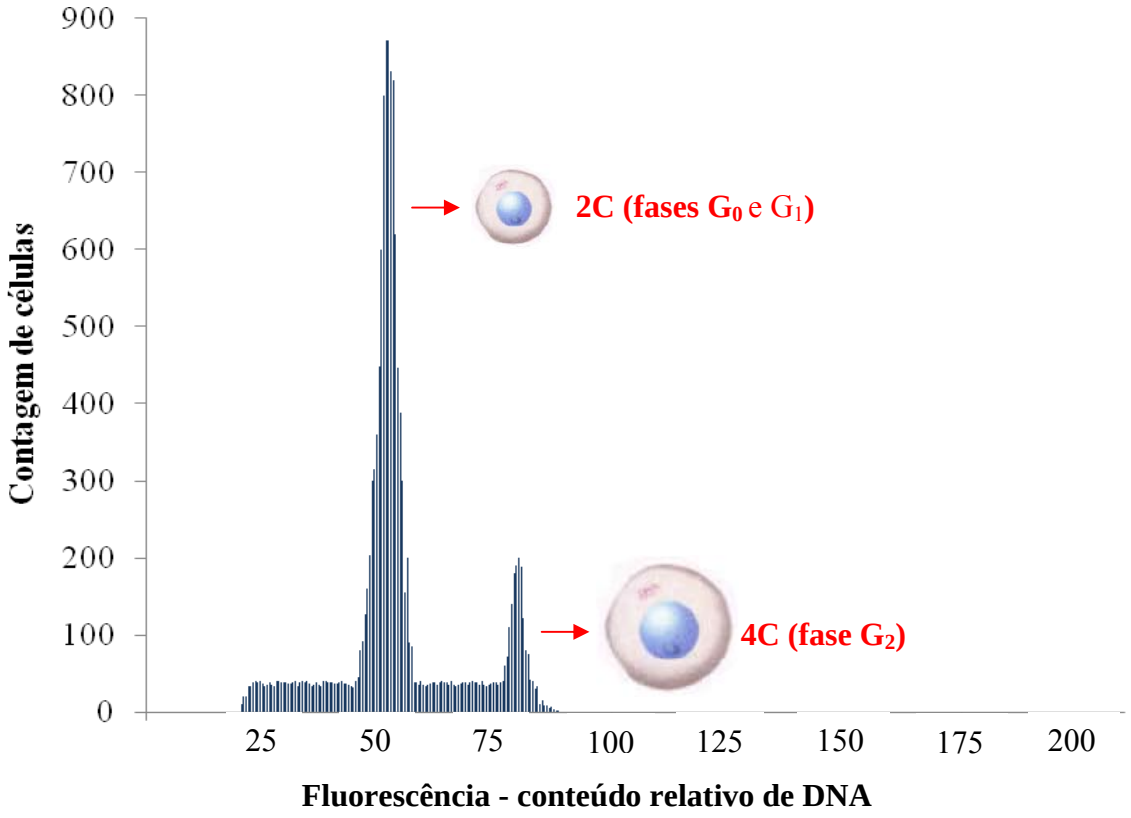


Figura 2 – Histograma representativo da citometria de fluxo

Os resultados de citometria são expressos em um histograma (Figura 2) e analisados separadamente. O conteúdo de DNA é proporcional ao sinal de fluorescência dos núcleos no citômetro e são expressos em valor de C, sendo 2C igual ao número de núcleos na fase G_1 (primeiro período de crescimento celular) do processo de divisão celular e 4C igual ao número de núcleos na fase de divisão celular G_2 (segundo período de crescimento celular)

(Figura 2). Podem ocorrer casos em que são observados núcleos 8C, 16C, 32C, etc que são iguais a núcleos que passaram por endorreduplicação. Os resultados são apresentados em um histograma em que os picos são mensurados, permitindo a obtenção da porcentagem do total de núcleos em cada pico do histograma, ou seja, em cada fase do processo de divisão celular (Figura 2).

2.2.5 Análise estatística

Para o experimento I, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições; foi realizada análise de regressão dos resultados obtidos para todos os parâmetros avaliados, considerando o modelo mais adequado para cada tratamento.

Para o experimento II, foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos (número de cultivares) e cinco repetições para cada cultivar e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o experimento III também foi realizado um experimento inteiramente casualisado em esquema fatorial 2x2 (populações de nematoides x estresse hídrico) para cada cultivar e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Experimento I

2.3.1.1 Avaliações do desenvolvimento e fenologia das plantas

Nas figuras 3 e 4 estão apresentados os ciclos das plantas de soja em cada tratamento de população inicial para cada um dos nematoides. Foram considerados na apresentação dos gráficos apenas os estádios fenológicos de V (vegetativo), R_1 até R_4 (florescimento e formação de vagens), $R_{5.1}$ até $R_{5.5}$ (enchimento de vagens) e R_6 até $R_{8.3}$ (vagens cheias e senescência).

Para os dois nematoides estudados, o ciclo mais longo foi observado para as plantas em que não foram realizadas inoculações com nematoides. Dessa forma, estes foram considerados como sendo 100%. Os ciclos máximos foram de 128 dias para as plantas não inoculadas no experimento de *M. javanica* e de 124 dias para as plantas não inoculadas no experimento de *P. brachyurus*.

Verificou-se em ambos os casos que houve redução no ciclo da planta quando estas foram inoculadas com nematoides, independentemente da população inicial e da espécie.

Porém, quando se analisou os estádios fenológicos de cada tratamento, verificou-se que não houve redução nos estádios vegetativos, de florescimento, de formação e enchimento das vagens. A diminuição do ciclo total foi devida à redução do estádio de senescência, demonstrando que a presença de nematoides em raízes de soja provocou a morte prematura da planta e, consequentemente, afetou o ciclo desta.

Para *M. javanica*, foi verificada redução de ciclo de 5,4 % e do estádio de senescência de 26,9 % para tratamento de população inicial igual a 150 nematoides por planta (Figura 3). Para *P. brachyurus*, a redução máxima verificada de ciclo foi de 4,1% e do estádio de senescência de 19,2 % no tratamento de população inicial igual a 450 e 2400 nematoides por planta (Figura 4).

Após atingir o estádio R_6 e durante a senescência normal de plantas de soja, o tamanho das sementes reduz, o formato muda de oval para esférica, a coloração muda de verde para amarela (devido à degradação da clorofila) e o teor de água é consideravelmente reduzido (SALE; CAMPBELL, 1980, BURRIS, 1973, GUIAMÉT et al., 1991). Portanto, qualquer alteração que ocorra durante a senescência, promovendo a redução desse período, poderá prejudicar o processo de formação das sementes produzindo sementes maiores, de formato ovalado ou de coloração esverdeada.

O relato da presença de nematoide em plantas de soja provocando a morte prematura é um indício de que este pode estar associado à ocorrência de sementes esverdeadas, pois vários autores (WIEBOLD, 2008; BOHNER, 2003; FRANÇA NETO et al., 2005) destacaram que a incidência destas sementes é devida à ocorrência de estresses, bióticos ou abióticos, após a maturidade fisiológica, que podem provocar a morte prematura da planta e impedir que a clorofila presente nas sementes se degrade de forma adequada.

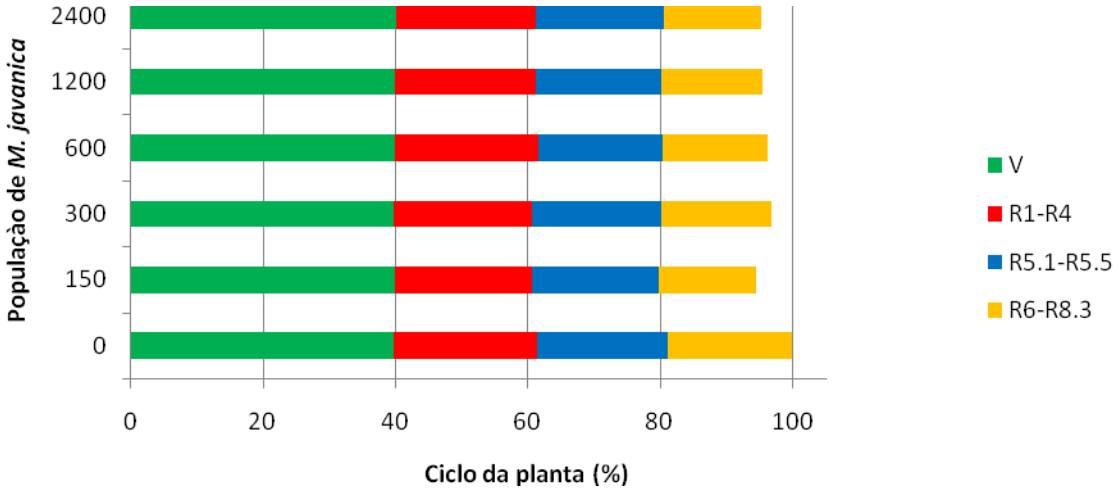


Figura 3 - Porcentagem de redução do ciclo de plantas de soja, cultivar Pintado, após a inoculação de diferentes populações iniciais de *M. javanica* comparado com plantas não inoculadas (população 0). V – estádio vegetativo, R_1-R_4 – florescimento e formação de vagens, $R_{5.1}$-$R_{5.5}$ – enchimento de vagens e R_6-$R_{8.3}$ – vagens cheias e senescência

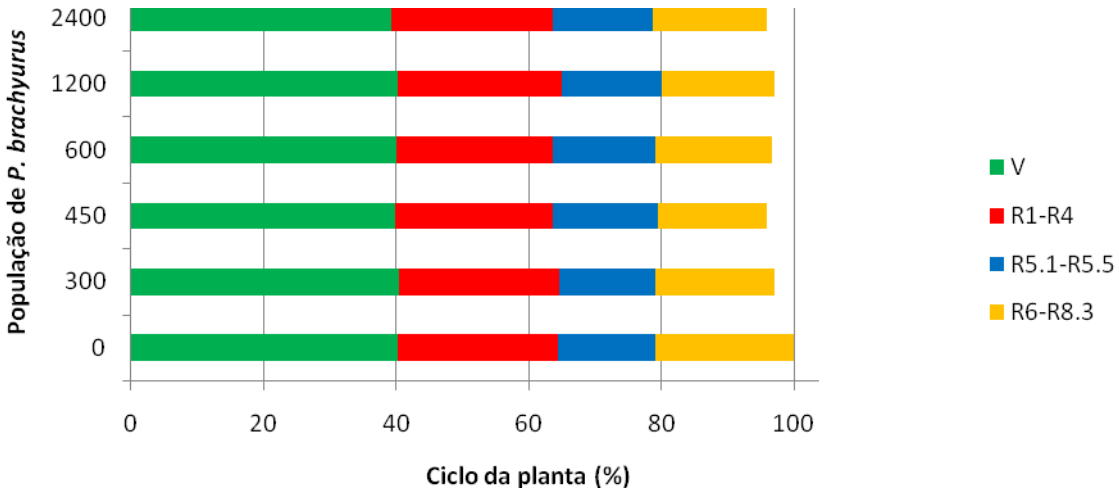


Figura 4 - Porcentagem de redução do ciclo de plantas de soja, cultivar Pintado, após a inoculação de diferentes populações iniciais de *P. brachyurus* comparado com plantas não inoculadas (população 0). V – estádio vegetativo, R_1-R_4 – florescimento e formação de vagens, $R_{5.1}$-$R_{5.5}$ – enchimento de vagens e R_6-$R_{8.3}$ – vagens cheias e senescência

Na figura 5, pode-se observar plantas de soja submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação com *M. javanica,* aos 117 dias após a semeadura e 103 dias após a inoculação. Verificou-se em plantas não inoculadas, maior quantidade de folhas que se mantiveram verdes e ficaram retidas nas plantas em relação as plantas que foram inoculadas.

Figura 5 - Plantas de soja, com 117 dias após a semeadura e 103 dias após a inoculação, submetidas à diferentes populações iniciais (nematoides por planta) de *Meloidogyne javanica*

De maneira similar ao ocorrido com as plantas inoculadas com *M. javanica*, aquelas inoculadas com *P. brachyurus* aos 116 dias após a semeadura e 102 dias após a inoculação atingiram o período de senescência precocemente, enquanto as não inoculadas mantiveram as

folhas verdes, as quais ficaram retidas nas plantas. O efeito da presença de nematoides foi mais evidente para as plantas inoculadas com *P. brachyurus* (Figura 6).

Muitos autores destacaram para várias culturas que, entre os sintomas gerais de ataques de nematoides no campo, o amarelecimento das folhas e a posterior queda prematura destas são os mais visíveis e importantes (ASMUS; FERRAZ, 2001; LORDELO, 1988; MOURA; PEDROSA; PRADO, 2002; GARCIA; COSTA; RODRIGUES, 2000; SHARMA et al., 2005), pois afetam diretamente a produtividade e podem provocar morte das plantas.

Figura 6 - Plantas de soja, com 116 dias após a semeadura e 101 dias após a inoculação, submetidas à diferentes populações iniciais (nematoides por planta) de *Pratylenchus brachyurus*

2.3.1.2 Avaliações de nematoides, desempenho de plantas e de sementes

2.3.1.2.1 Meloidogyne javanica

Na tabela 1 estão apresentados os resultados de massa de matéria fresca de raiz, população final e fator de reprodução, considerando apenas nematoides e nematoides mais ovos, de *M. javanica* para todos os tratamentos testados. Verificou-se que a menor massa de matéria fresca de raiz foi verificada para o tratamento sem inoculação de nematoide e as maiores para as plantas submetidas a 600 e 1200 nematoides por planta. Como o *M. javanica* é uma espécie de nematoide formadora de galhas, espera-se que, em grandes populações de nematoides, a formação de galhas seja maior e consequentemente a massa de matéria fresca de raiz também seja mais elevada (WALLACE, 1971; ASMUS; FERRAZ, 2001; CARNEIRO, 2000). O oposto foi verificado por Rocha et al. (2008), em que houve redução na massa de raízes de plantas de soja inoculadas com 100, 200 e 300 espécimes de *M. javanica* e *Heterodera glycines* quando avaliado aos 20 dias em relação às plantas não inoculadas. Segundo os autores, na presença do nematoide pode ter ocorrido carência de nutrientes e, assim, comprometimento do sistema radicular.

A população final foi maior para as plantas inoculadas com 2400 nematoides por vaso e menor para aquelas inoculadas com 300 nematoides (Tabela 1). Foi observado aumento da população final e da população final + ovos à medida que se aumentou a população inicial, exceto para a população de 300 nematoides, em que foi verificada uma redução em relação à população de 150 nematoides (Figura 7). Por outro lado, para o fator de reprodução foi observado redução à medida que se aumentou a população inicial, exceto para a população inicial de 300 nematoides (Tabela 1 e Figura 8). O fator de reprodução é inversamente proporcional à população inicial devida a competição intraespecífica da população do nematoide. O fator de reprodução foi maior para as plantas inoculadas com 150 nematoides e menor para as inoculadas com 2400 nematóides por planta (Tabela 1).

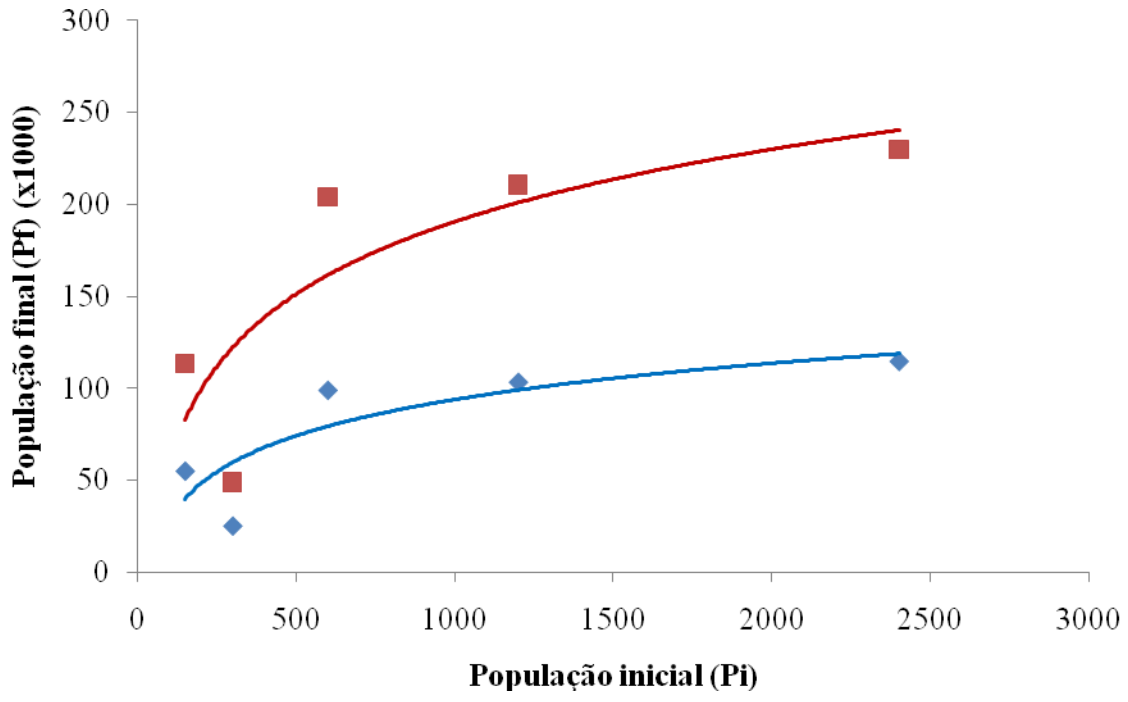
A reprodução de *M. javanica* expressa pelo fator de reprodução (Tabela 1) seguiu os padrões esperados para o crescimento de populações de nematoides em função da população inicial. Assim, a população em baixos níveis iniciais, cresce exponencialmente por um pequeno período de tempo, enquanto as populações mais altas, devido à competição por alimento e,ou a outra limitação qualquer imposta pelo ambiente, passa a apresentar depois taxas cada vez menores de reprodução (ASMUS; FERRAZ, 2001).

Di Vito, Greco e Carella (1983) destacaram que, sob altas populações iniciais, a planta infectada é gravemente danificada pelo nematoide, resultando em significativa redução do sistema radicular, o qual seria insuficiente para hospedar grandes populações de nematoides após a multiplicação. Dessa forma, após um determinado período, muitos nematoides morreriam no solo ou seriam incapazes de penetrar as raízes antes de completar o seu desenvolvimento.

Tabela 1 - Resultados de massa de matéria fresca de raiz (g), população final (Pf) e fator de reprodução (FR) considerando apenas formas móveis do nematóide e população final (Pf) e fator de reprodução (FR) considerando formas móveis e ovos de *M. javanica* em plantas de soja após inoculação com diferentes populações

Tratamento	Massa raiz[+]	Pf	FR	Pf (+ ovos)	FR (+ovos)
0	55,4	0	0	0	0
150	64,6	54876	365,8	113456	756,4
300	64,3	25121	83,7	49122	163,7
600	74,4	98762	164,6	204089	340,1
1200	75,4	103185	86,0	210671	175,6
2400	58,5	114478	47,7	229778	95,7

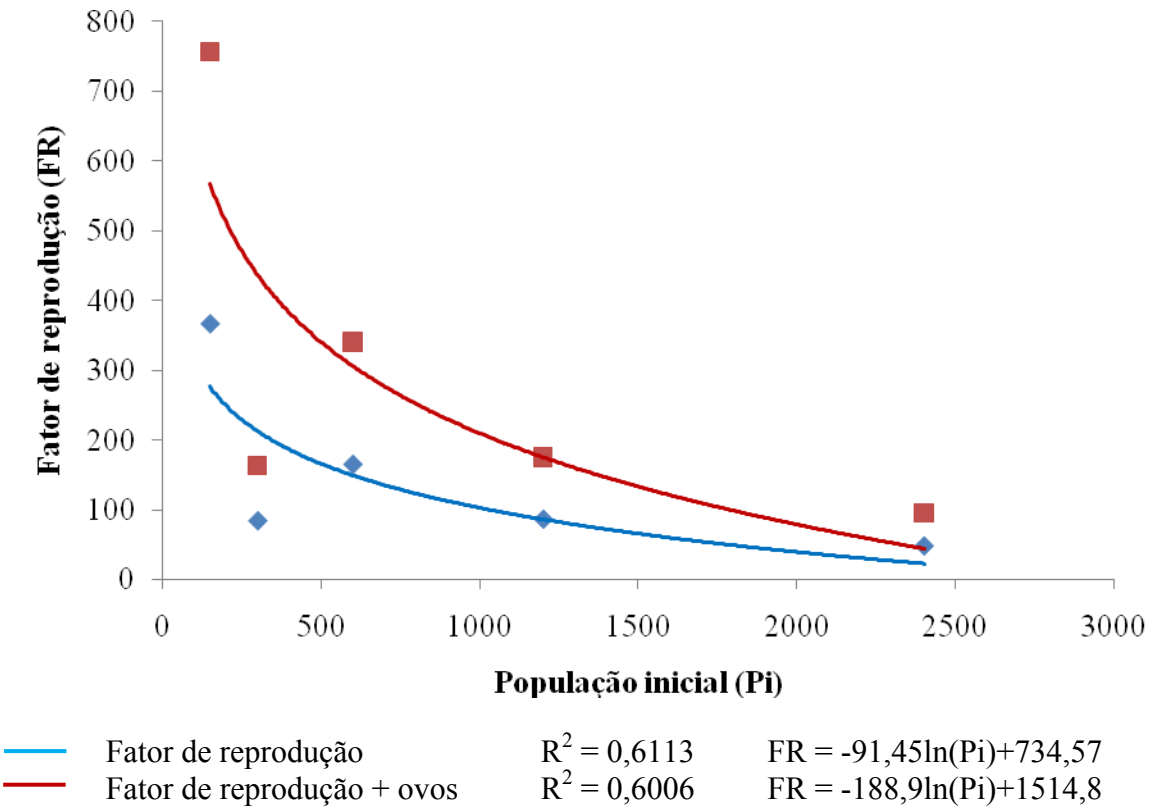
[+] Análise de regressão não significativa à 10% de probabilidade.



População final $R^2 = 0,6805$ PF = 28460ln(Pi)-102771

População final + ovos $R^2 = 0,6521$ PF = 56870ln(Pi)-202370

Figura 7 - População final considerando apenas formas móveis e população final considerando formas móveis e ovos de *M. javanica* em plantas de soja após inoculação com diferentes populações



$R^2 = 0,6113$ FR = -91,45ln(Pi)+734,57

$R^2 = 0,6006$ FR = -188,9ln(Pi)+1514,8

Figura 8 - Fator de reprodução considerando apenas formas móveis e fator de reprodução considerando formas móveis e ovos de *M. javanica* em plantas de soja após inoculação com diferentes populações

O número de vagens, o número de sementes, a massa de matéria seca de sementes por planta, a massa de 100 sementes e a massa de matéria seca de parte aérea diminuíram à medida que se aumentou a população inicial de *M. javanica* (Figuras 9 e 10), desconsiderando a população inicial de 0, em que foi observado menor valor para todos os parâmetros avaliados, exceto para a massa de 100 sementes (Tabela 2).

A maior produção de vagens e de sementes em plantas com baixas populações de nematoide é, aparentemente, resultado de um efeito estimulante de um estresse moderado causado pelas baixas populações de nematoides na produtividade. Este tipo de resposta foi relatado para outras espécies de nematoides (SCHIMITT; BARKER, 1981; SEINHORST; den OUDEN, 1971).

Em trabalho com plantas de algodão inoculadas ou não com 500 e 5000 ovos de *Meloidogyne incognita* foi observada tendência de maiores valores de altura, massa seca de folhas nos tratamentos com 500 ovos em relação aos com 5000 ovos e a testemunha (ABRÃO; MAZZAFERA, 2001). Para as plantas de soja, além desse efeito estimulante das baixas populações, até mesmo a população mais elevada (2400 nematoides) pode não ter sido

suficiente para causar prejuízos severos à produtividade, ou então a cultivar Pintado, apesar de multiplicar o nematoide, pode ser tolerante à presença de *M. javanica* nas raízes.

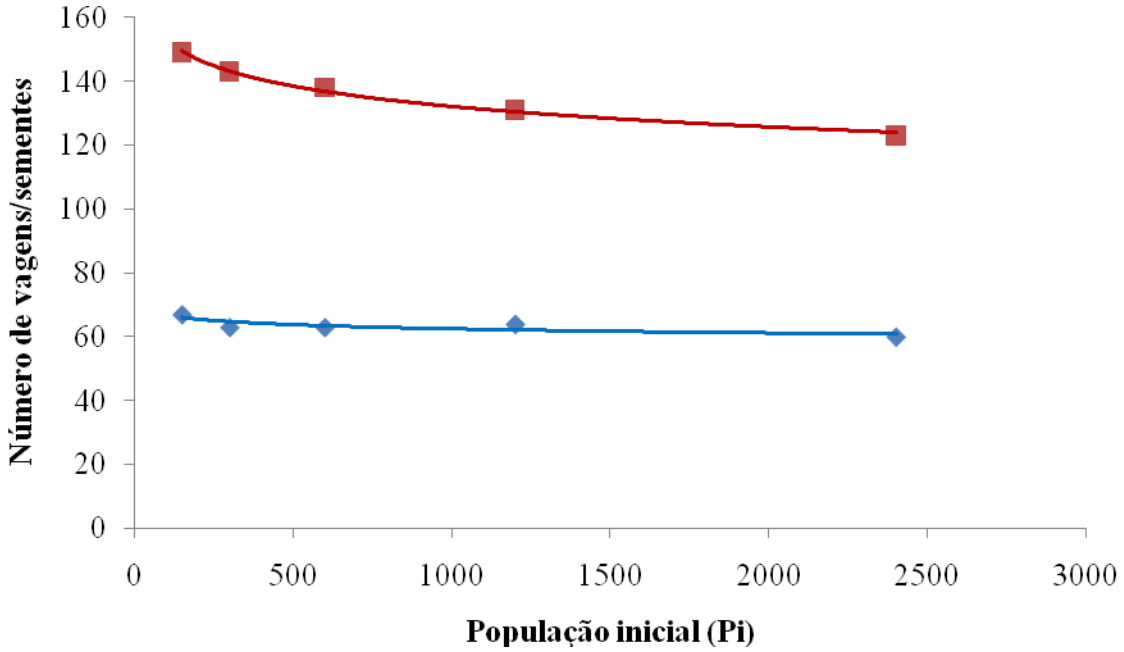
Por outro lado, alguns trabalhos correlacionaram negativamente as densidades populacionais iniciais de nematoides com parâmetros de produção como a altura da planta, a massa fresca de parte aérea e de raiz e a área foliar de leguminosas como soja e ervilha (SHARMA; FONSECA, 2000; ASMUS; FERRAZ, 2001). Sharma e Rodriguéz (1982), trabalhando com plantas de soja inoculadas com populações iniciais de 0, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 mil espécimes de *M. javanica* por planta, verificaram efeito na altura de plantas, na massa de raízes, no número de grãos e vagens e na massa fresca de parte aérea à medida, que aumentavou a densidade populacional do nematoide, alcançando praticamente 98% de redução nas populações iniciais de 32 mil nematoides por planta. O mesmo foi verificado em experimento de tabaco com diferentes populações de *M. incognita*, no qual, à medida que se aumentava a população do nematoide, observava-se redução na produção de folhas, sendo a população de 2 espécimes.ml^{-1} de solo suficiente para causar redução significativa e perda na produção das plantas (Di VITO; GRECO; CARELLA, 1983).

As populações iniciais utilizadas nos experimentos citados acima foram muito elevadas quando comparadas as utilizadas nesta pesquisa, o que justifica as grandes diferenças encontradas entre os experimentos. Optou-se por populações menores para que o efeito na produtividade não fosse muito drástico, possibilitando realizar a colheita de sementes para as posteriores análises de qualidade.

Os dados de massa de 100 sementes foram maiores para as sementes produzidas nas plantas sem a presença de nematoides e decresceu gradativamente à medida que se aumentava a população inicial destes (Figura 10). O potencial produtivo e a massa de 100 sementes depende da taxa e do período de acúmulo de matéria seca desde o começo do processo de formação das vagens (EGLI, 1998; SUMMERFIELD, 1978); quanto maior o número de sementes produzidas, menor será a taxa de fotoassimilados disponibilizados para cada semente, produzindo sementes de menor massa. Por outro lado, a maior massa de sementes nos tratamentos de menor população pode ser devido à possível interferência de *M. javanica* na absorção e transporte interno de solutos e de fotoassimilados; assim, seria indicado que os nematoides em desenvolvimento nas raízes podem atuar como eficientes drenos metabólicos (CARNEIRO; MAZZAFERA; FERRAZ, 1999), prejudicando o processo de formação e reduzindo a massa de sementes.

Tabela 2 - Número de vagens e de sementes, massa de matéria seca de sementes por planta (MMSS), massa de 100 sementes (M100S) e massa de matéria seca de parte aérea por planta (MMSPA), em gramas, em plantas inoculadas com diferentes populações de *M. javanica*

Tratamento	nº vagens	nº sementes	MMSS	M100S	MMSPA
0	54	114	18,0	16,2	13,5
150	67	149	22,9	15,3	17,2
300	63	143	22,0	15,3	16,0
600	63	138	20,3	15,0	16,1
1200	64	131	18,8	14,5	16,3
2400	60	123	18,0	14,7	15,2



Número de vagens $R^2 = 0,6706$ nº vagens = -1,876ln(Pi)+75,397
Número de sementes $R^2 = 0,9922$ nº sementes = -9,233ln(Pi)+195,86

Figura 9 - Número de vagens e número de sementes de soja em plantas inoculadas com diferentes populações de *M. javanica*

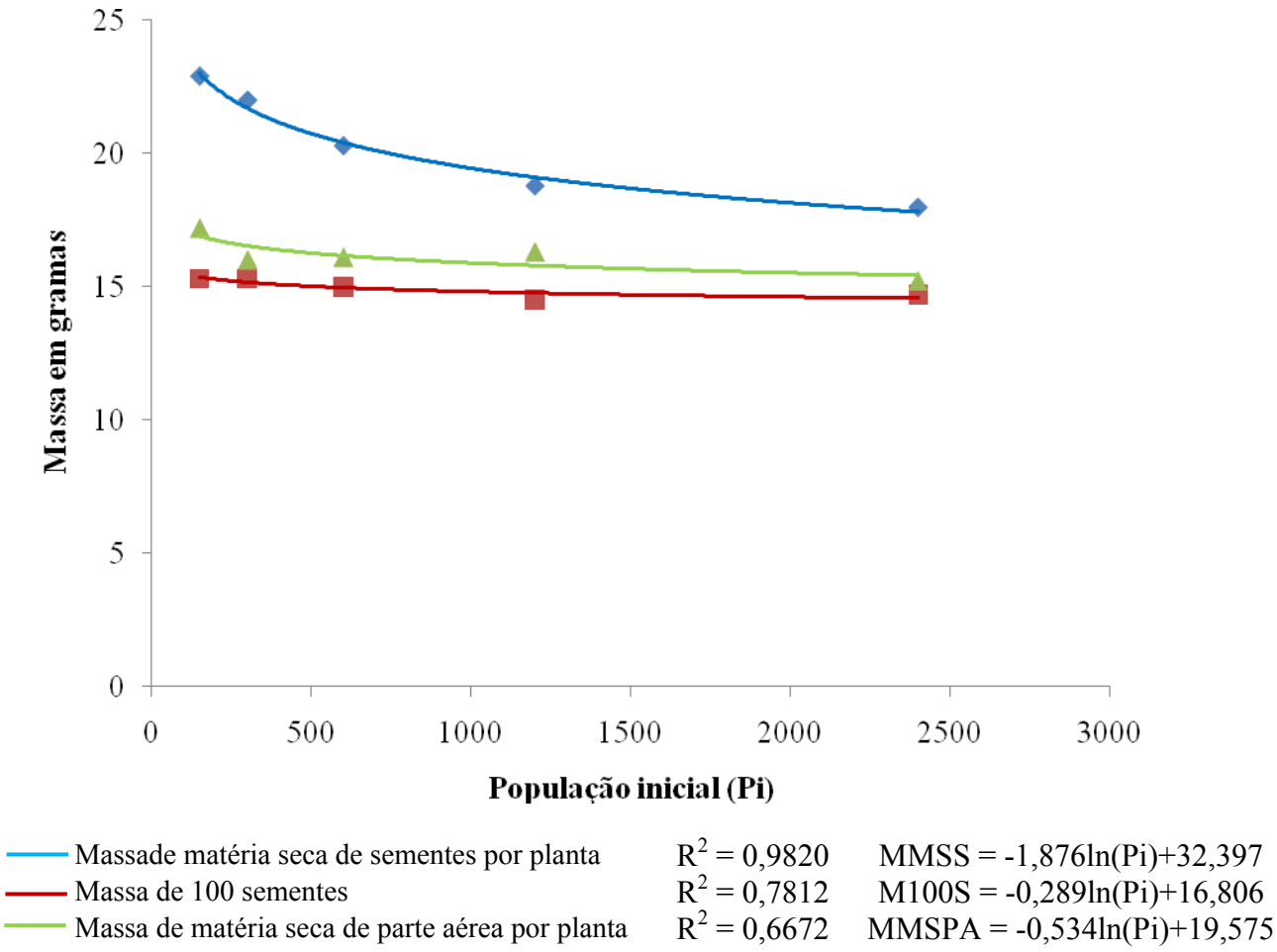


Figura 10 - Massa de matéria seca de sementes por planta, massa de 100 sementes e massa seca de parte aérea por planta em plantas inoculadas com diferentes populações de *M. javanica*

Para *M. javanica*, não foram verificadas diferenças no potencial fisiológico das sementes e na ocorrência de sementes esverdeadas em todos os tratamentos aos quais as plantas foram submetidas (Tabela 3).

Tabela 3 - Teor de água (T.A.), germinação (G), envelhecimento acelerado (E.A.) e ocorrência de sementes esverdeada (S.V.), em porcentagem, e condutividade elétrica (C.E.), em µS cm^{-1} g^{-1}, de sementes produzidas em plantas inoculadas com diferentes populações de *M. javanica*

Tratamento	T.A	G+	E.A.+	C.E.+	S.V.+
0	8,2	100	95	43,26	0,5
150	8,4	98	96	40,67	0,0
300	8,3	100	97	40,88	1,0
600	8,4	99	96	43,48	1,0
1200	8,6	99	98	42,11	1,5
2400	8,4	100	99	41,11	1,0

+ Análise de regressão não significativa à 10% de probabilidade.

2.3.1.2.2 Pratylenchus brachyurus

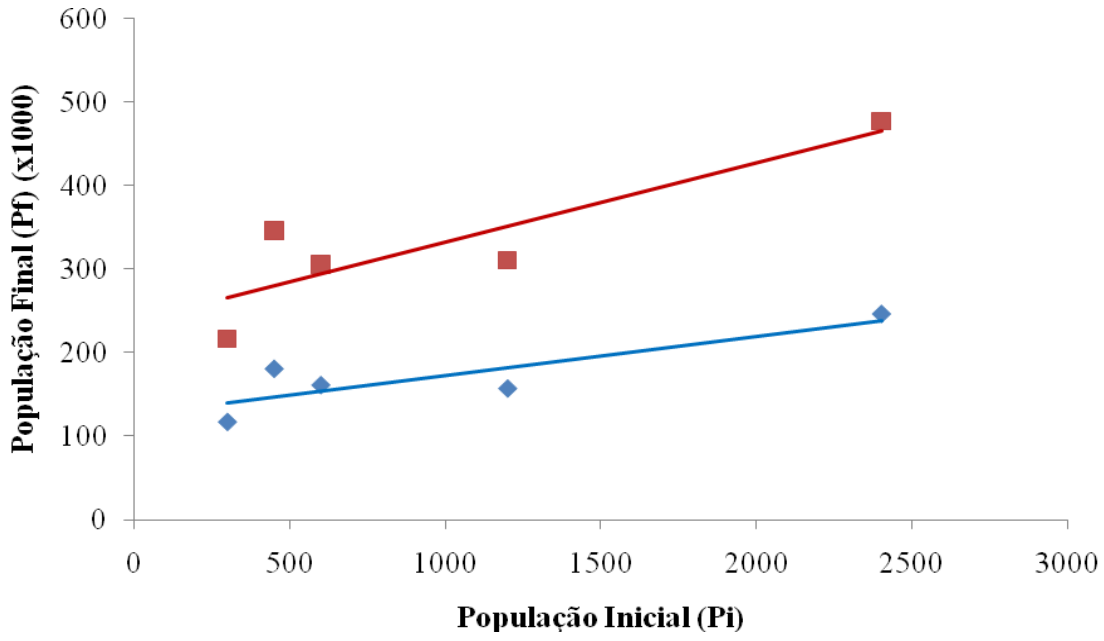
Após a colheita das sementes e avaliação das raízes de plantas de soja submetidas aos diferentes tratamentos de população inicial de *P. brachyurus*, foi verificado que não houve relação entre a massa fresca de raiz e a população inicial de nematoides para todos os tratamentos testados (Tabela 4). A população final de nematoides e nematoides mais ovos final aumentou com o aumento da população inicial (Figura 11). Assim como para *M. javanica*, na determinação da análise de regressão não foram utilizados os resultados do tratamento sem a presença de nematoides; então, cinco pontos foram utilizados para a confecção da curva (Figura 11 e 12). Em todos os casos em que houve inoculação de nematoides, o fator de reprodução foi elevado (acima de 100), sendo maior para os tratamentos de menor população inicial, e diminuindo com o aumento da população inicial (Tabela 4 e Figura 12).

Em muitos trabalhos de nematologia, foi verificado que a população final de nematoides é diretamente proporcional e o fator de reprodução é inversamente proporcional à população inicial. Machado et al., (2006) em experimento com algodão, cultivar Delta Opal, avaliaram o efeito das populações de 0, 3000, 12000 e 30000 de *P. brachyurus* por planta no desenvolvimento desta e evidenciaram que, à medida que se eleva a população inicial, ocorre aumento da população final de nematoide e redução do fator de reprodução. Em experimento de campo realizado com trigo e cevada infectados por *Heterodea havenae*, foi observado o mesmo comportamento das populações de nematoides (IBRAHIM et al., 1999).

Tabela 4 - Resultados de massa de matéria fresca de raiz (g), população final (Pf) e fator de reprodução (FR) considerando apenas formas móveis do nematoide e população final (Pf) e fator de reprodução (FR) considerando formas móveis e ovos de *P. brachyurus* em plantas de soja após inoculação com diferentes populações

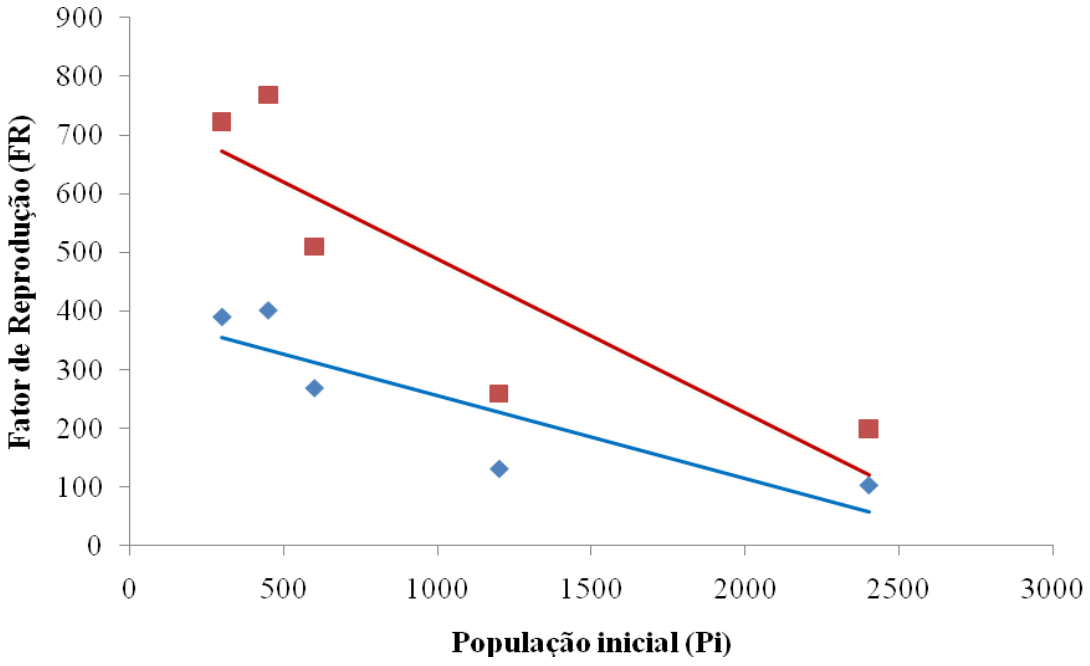
Tratamento	Massa raiz[+]	Pf	FR	Pf (+ ovos)	FR (+ovos)
0	66,6	0	0	0	0
300	60,5	116916	389,7	216565	721,9
450	59,7	180434	400,9	345907	768,7
600	64,6	160936	268,2	306071	510,1
1200	68,4	156779	130,6	310959	259,1
2400	65,6	245993	102,5	477338	198,9

[+] Análise de regressão não significativa à 10% de probabilidade.



População final	$R^2 = 0,732$	PF = 125629+47,05xPi
População final + ovos	$R^2 = 0,756$	PF (+ ovos) = 236540+95,79xPi

Figura 11 - População final considerando apenas formas móveis e população final considerando formas móveis e ovos de *P. brachyurus* em plantas de soja após inoculação com diferentes populações



Fator de reprodução	$R^2 = 0,7574$	FR = 398,90-0,1417xPi
Fator de reprodução + ovos	$R^2 = 0,7583$	FR = 752,41-0,263xPi

Figura 12 – Fator de reprodução considerando apenas formas móveis e fator de reprodução considerando formas móveis e ovos de *P. brachyurus* em plantas de soja após inoculação com diferentes populações

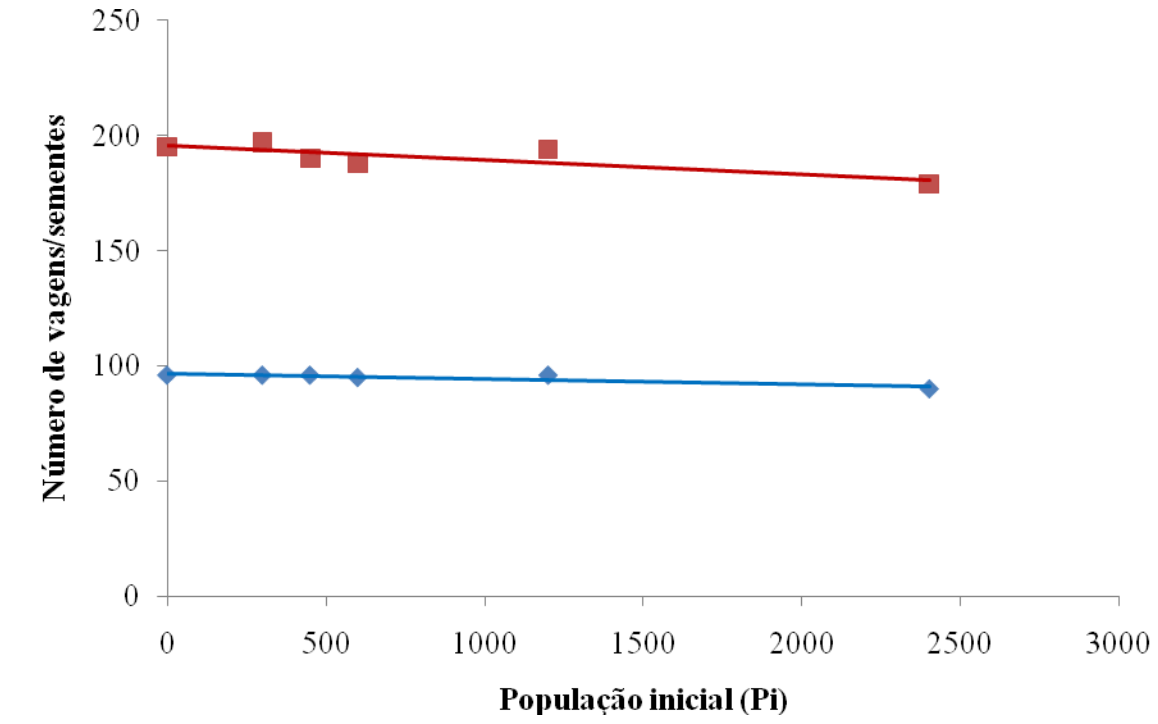
Na tabela 5 estão apresentados os parâmetros de avaliação de produtividade para as plantas inoculadas ou não com *P. brachyurus*.

Para o número de vagens e de sementes, foi observado redução com o aumento da população inicial (Figura 13), porém a redução foi muito pequena. O R^2 de 0,7831 para o número de vagens demonstra que aproximadamente 78% da variação desse número pode ser explicado pela relação linear com a população inicial de nematoides, considerando a um nível de 10% de probabilidade. O mesmo se deu para o número de sementes, porém com um R^2 mais baixo, de apenas 0,666 (Figura 13). Mesmo ocorrendo alta reprodução dos nematoides, não foram verificadas relações entre a população inicial de nematoide com a massa de matéria seca de sementes por planta, com a massa de 100 sementes e com a massa de matéria seca de parte aérea para todos os tratamentos testados (Tabela 5). Nestes casos, assim como para as plantas inoculadas com *M. javanica*, a população inicial do nematoide pode não ter sido suficiente para provocar problemas na massa de sementes e na parte aérea ou então, como não existem relatos, essa cultivar pode ser tolerante a presença de *P. brachyurus*, ou seja, o nematoide é capaz de se multiplicar na planta sem ocasionar sintomas ou prejudicar a produtividade da cultura.

Tabela 5 - Número de vagens e de sementes, massa de matéria seca de sementes por planta (MMSS), massa de 100 sementes (M100S) e massa de matéria seca de parte aérea por planta (MMSPA), em gramas, em plantas de soja inoculadas com diferentes populações de *P. brachyurus*

Tratamento	**nº vagens**	**nº sementes**	**MMSS**[+]	**M100S**[+]	**MMSPA**[+]
0	96	195	26,5	13,5	29,5
300	96	197	26,4	13,5	28,8
450	96	190	26,4	13,8	29,9
600	95	188	25,4	13,5	30,3
1200	96	194	27,8	14,3	29,9
2400	90	179	24,8	13,8	28,6

[+] Análise de regressão não significativa à 10% de probabilidade.



Número de vagens	$R^2 = 0,7831$	nº vagens = 96,85-0,0024xPi
Número de sementes	$R^2 = 0,666$	nº sementes = 195,57-0,0062xPi

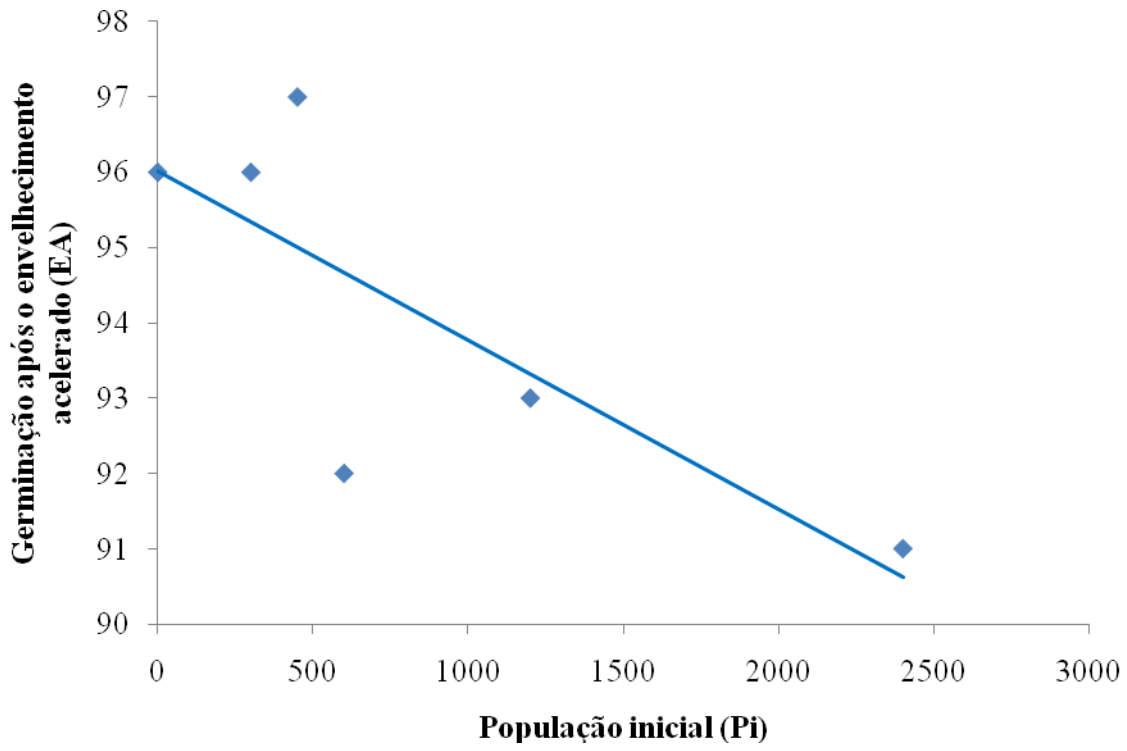
Figura 13 - Número de vagens e número de sementes de soja em plantas inoculadas com diferentes populações de *P. brachyurus*

De forma semelhante ao verificado para alguns parâmetros de produtividade, não ocorreu diferença no potencial fisiológico, exceto para o envelhecimento acelerado (Tabela 6) no qual foi observado redução na germinação das sementes à medida que se aumentava a população inicial (Figura 14). Para as plantas inoculadas com *P. brachyurus*, praticamente não foi observada ocorrência de sementes esverdeadas de soja nos diferentes tratamentos (Tabela 6). Muitas empresas destacaram que plantas da cultivar Pintado, quando submetidas a uma situação de estresse, não são muito sensíveis a ocorrência de sementes esverdeadas. Entretanto, foi feita a escolha desta cultivar no primeiro experimento pelo fato de ser conhecidamente suscetível aos dois nematoides em estudo, proporcionando alterações na fenologia da planta.

Tabela 6 - Teor de água (T.A.), germinação (G), envelhecimento acelerado (E.A.) e ocorrência de sementes esverdeada (S.V.), em porcentagem, e condutividade elétrica (C.E.), em µS cm^{-1} g^{-1}, de sementes produzidas em plantas inoculadas com diferentes populações de *P. brachyurus*

Tratamento	T.A	G+	E.A.	C.E.+	S.V.+
0	8,8	94	96	41,25	0,0
300	8,7	96	96	34,92	1,0
450	8,4	95	97	37,43	0,0
600	8,8	96	92	31,33	0,0
1200	8,2	95	93	35,16	0,5
2400	8,4	96	91	33,74	0,0

+ Análise de regressão não significativa à 10% de probabilidade.



Envelhecimento Acelerado $R^2 = 0,6181$ EA = 96,02-0,0023Pi

Figura 14 - Germinação de sementes após o envelhecimento acelerado de sementes de soja proveniente de plantas inoculadas com diferentes populações de *P. brachyurus*

2.3.2 Experimento II

A avaliação da resistência dos genótipos de soja, em valores médios de fator de reprodução se encontram nas tabelas 7 e 8.

Nas raízes de todos os cultivares testados, *Meloidodogyne javanica e Pratylenchus brachyurus* apresentaram capacidade de se reproduzir, variando os fatores de reprodução

entre 1,2 a 4,6 (Tabela 7) e 1,4 a 4,1 (Tabela 8), respectivamente para cada nematoide. A suscetibilidade das cultivares de soja coincide com a maioria dos trabalhos até o momento realizados para avaliação da reação de cultivares de soja (ASMUS; ANDRADE, 1996; FERRAZ, 1996; COSTA; FERRAZ, 1998; MENDES; RODRIGUEZ, 2000; MENDES et al., 2001; SOARES; SANTOS, 2009).

Os FR obtidos foram mais baixos, em comparação aos relatados anteriormente por alguns autores, para soja (MENDES et al., 2001; HILLOCKS; STOKES; JONES, 1995) e semelhante ao relatado por outros (SOARES; SANTOS, 2009; FERRAZ, 1996; COSTA; FERRAZ, 1998; MENDES; RODRIGUES, 2000).

Durante o período de condução do experimento em casa de vegetação (junho a agosto de 2011), a temperatura média máxima na casa de vegetação foi de 35,0 ^{o}C e mínima de 13,4 ^{o}C e no solo a temperatura média máxima foi de 33,4 ^{o}C e a mínima de 12,3 ^{o}C. Segundo Olowe e Corbett (1976), uma geração de *P. brachyurus* é completada em quatro semanas a 30-35 ^{o}C, em raízes excisadas de milho; mas são necessárias 14 semanas a 15 ^{o}C. Para *Meloidogyne spp.*, o intervalo de temperatura de 15 ^{o}C a 30 ^{o}C possibilita o desenvolvimento da maioria das espécies (WALLACE, 1971), porém, a taxa de embriogênese em *M. javanica* sob temperatura de 15 ^{o}C é aproximadamente 4 a 5 vezes menor do que aquela à 30 ^{o}C (BIRD, 1972) e, consequentemente, a taxa de eclosão de J2 também é reduzida (GOODELL; FERRIS, 1989).

De qualquer forma, em nenhuma cultivar o FR ficou abaixo de 1. Portanto, mesmo nas condições experimentais deste trabalho, com temperaturas desfavoráveis a *M. javanica* e *P. brachyurus* (OLOWE; CORBETT, 1976), o uso de qualquer uma das cultivares avaliadas como cultura de segunda safra irá resultar no aumento populacional desses nematoides.

Apesar de nenhuma cultivar ter sido classificada como resistente, algumas se destacaram como sendo mais suscetíveis com maiores valores de fator de reprodução, tais como as cultivares M 8866, TMG 115 RR e M 7908 RR para *M. javanica* (Tabela 7) e TMG 155 RR, TMG 131 RR, Tucunaré, M 7908 RR, TMG 801e Pintado para *P. brachyurus* (Tabela 8).

Tabela 7 - Fator de reprodução de *Meloidogyne javanica* em 10 cultivares de soja

Cultivares de soja	Fator de reprodução	Reação
TMG 115 RR	4,2 ab	S*
TMG 131 RR	1,8 e	S
Tucunaré	3,1 cd	S
M 7908 RR	3,2 bc	S
M 8867 RR	1,3 e	S
M 8866	4,6 a	S
Tabarana	1,4 e	S
TMG 801	1,2 e	S
TMG 103 RR	1,4 e	S
Pintado	2,1 de	S
CV (%)	21,33	

*Suscetível

Tabela 8 - Fator de reprodução de *Pratylenchus brachyurus* em 10 cultivares de soja

Cultivares de soja	Fator de reprodução	Reação
TMG 115 RR	2,4 abc	S*
TMG 131 RR	4,1 a	S
Tucunaré	3,3 ab	S
M 7908 RR	2,2 abc	S
M 8867 RR	1,9 bc	S
M 8866	1,4 c	S
Tabarana	1,6 bc	S
TMG 801	2,9 abc	S
TMG 103 RR	1,8 bc	S
Pintado	2,3 abc	S
CV (%)	25,73	

*Suscetível

Os resultados obtidos no experimento II demonstraram que todos os cultivares poderiam ser utilizados no experimento III, porém, de acordo com algumas empresas produtoras de sementes, os cultivares M 7908 RR, TMG 115 RR e TMG 131 RR são considerados sensíveis á ocorrência de sementes esverdeadas. Dessa forma, foram escolhidos entre estas três cultivares, duas que tiveram maiores fatores de reprodução para os dois nematoides, sendo estas o M 7908 RR e o TMG 115 RR.

2.3.3 Experimento III

2.3.3.1 Avaliações do desenvolvimento e fenologia das plantas

Nas figuras 15, 16, 17 e 18 estão apresentados os ciclos das plantas de soja em cada tratamento de população inicial e de estresse hídrico para cada cultivar e nematoide. Assim como no experimento I, foram considerados na apresentação dos gráficos apenas os estádios fenológicos de V (vegetativo), R_1 até R_4 (florescimento e formação de vagens), $R_{5.1}$ até $R_{5.5}$ (enchimento de vagens) e R_6 até $R_{8.3}$ (vagens cheias e senescência). Para todos os casos, o ciclo mais longo observado foi considerado como sendo 100% e a redução do ciclo dos demais tratamentos foi calculada sempre em relação ao maior ciclo. Os ciclos máximos observados foram de 133 dias para as plantas da cultivar TMG-115RR para os dois nematoides e de 129 dias para as plantas da cultivar M 7908 RR para os dois nematoides.

Verificou-se para os dois cultivares nos experimentos com *M. javanica,* redução do ciclo da planta quando estas foram inoculadas com nematoides (Figuras 15 e 17). Porém, de forma semelhante ao experimento I, quando se analisou os estádios fenológicos de cada tratamento, observou-se que não houve redução nos estádios vegetativos, florescimento, formação e enchimento das vagens. A redução do ciclo total foi devido à redução do estádio de senescência, demonstrando que a presença de *M. javanica* em raízes de soja provocou a morte prematura da planta e, consequentemente, reduziu o ciclo desta.

Para *M. javanica*, foi verificada redução de ciclo de 6,8% para a cultivar TMG-115RR e de 4,0% para a cultivar M 7908 RR nos tratamentos com a presença de nematoide (Figuras 15 e 17).

Em ambas as cultivares, não foi observada alteração no ciclo das plantas que foram submetidas ao estresse hídrico em relação às não estressadas (Figuras 15 e 17). Isso foi importante, pois demonstrou que o estresse ao qual as plantas foram submetidas não foi suficiente para acelerar o processo de senescência, podendo apenas ter interferido na eficiência do parasitismo dos nematoides.

Em plantas de soja, o processo de senescência está associado com o processo de perda de água na planta e nas sementes (aproximadamente 90%); quanto mais próximo da senescência, menor a quantidade de água presente na planta (McINTYRE, 1987; SALE; CAMPBELL, 1980). Alguns autores (ADAMS; FJERSTAD; RINNE, 1983; WARD et al., 1995; SINNECKER, 2002) consideram que sementes que passam por desidratação de maneira mais rápida não perdem a clorofila no mesmo grau que as sementes desidratadas de

forma lenta. Em sementes de canola, uma rápida perda de umidade na câmara de secagem interrompeu o processo de degradação de clorofila, devido ao baixo grau de umidade nas sementes, resultando em altos níveis de clorofila. Assim, espera-se que, nas plantas que atingiram o estádio de senescência mais precocemente, o teor de clorofila nas sementes seja mais elevado (WARD et al., 1995).

Os efeitos fundamentais da água no desenvolvimento e metabolismo sugerem que esta pode tomar lugar de maior papel na evolução de vários mecanismos fisiológicos que regulam o padrão de desenvolvimento da planta. Uma drástica redução no conteúdo de água, com a aproximação da maturidade, explica a inibição de desenvolvimento e o declínio associado à atividade metabólica (McINTYRE, 1987). Como a degradação da clorofila ocorre de forma simultânea com a maturação das sementes, em casos em que a senescência ocorre precocemente, a clorofila pode não ser degradada devido à interrupção do metabolismo. Portanto, a maturidade das sementes no período adequado é importante para reduzir a possibilidade de presença de clorofila que produzem radicais livres, que podem causar danos oxidativos (JALINK et al., 1999) determinantes na longevidade e no vigor das sementes.

Para os experimentos conduzidos com *P. brachyurus*, em ambas as cultivares, não foi verificado redução do ciclo da planta, independentemente da presença ou não do nematoide (Figuras 16 e 18).

Existem relatos de que os nematoides de galhas geralmente são mais severos que os outros gêneros e que constituem o grupo de fitonematoides de maior importância em todo o mundo (WEISCHER; BROWN, 2001).

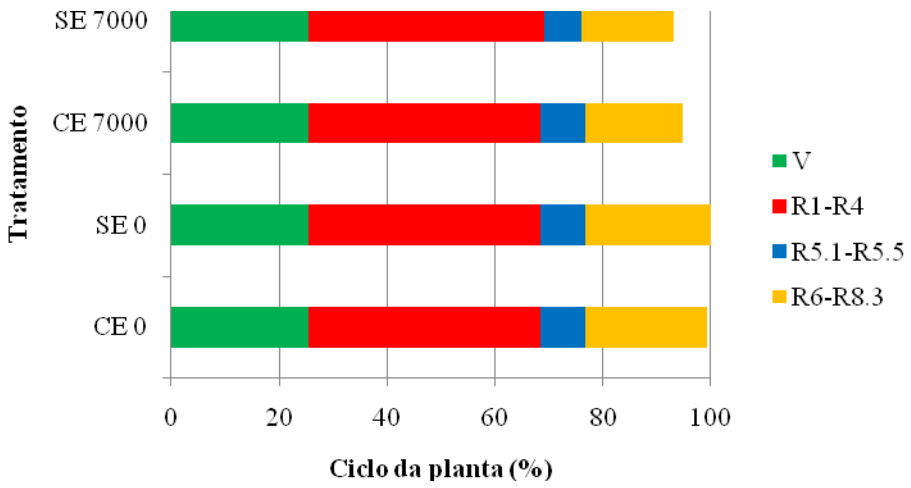


Figura 15 - Porcentagem de redução do ciclo de plantas de soja, cultivar TMG-115RR, em plantas inoculadas com 7000 espécimes de M. *javanica* submetidas ou não a estresse hídrico comparado com plantas não inoculadas (população 0) não submetidas ao estresse hídrico. V – estádio vegetativo, R_1-R_4 – florescimento e formação de vagens, $R_{5.1}$-$R_{5.5}$ – enchimento de vagens e R_6-$R_{8.3}$ – vagens cheias e senescência. SE – sem estresse hídrico, CE – com estresse hídrico

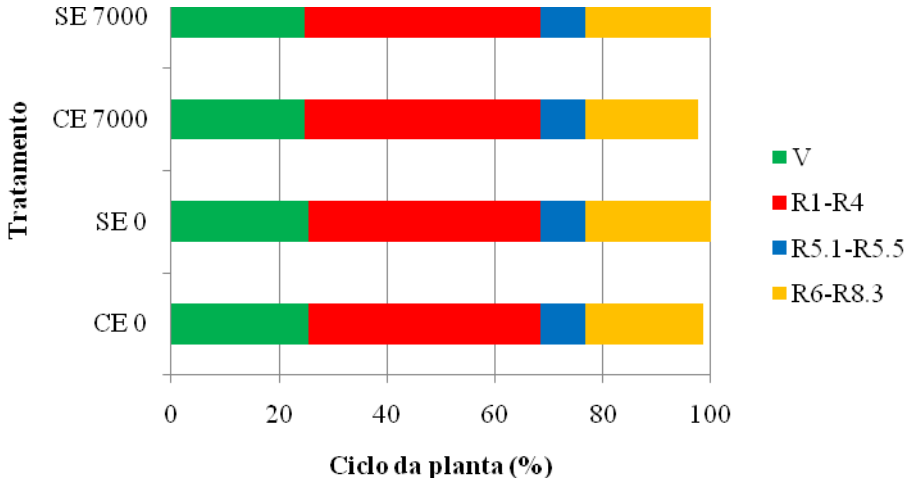


Figura 16 - Porcentagem de redução do ciclo de plantas de soja, cultivar TMG-115RR, em plantas inoculadas com 7000 espécimes de *P. brachyurus* submetidas ou não a estresse hídrico comparado com plantas não inoculadas (população 0) não submetidas ao estresse hídrico. V – estádio vegetativo, R_1-R_4 – florescimento e formação de vagens, $R_{5.1}$-$R_{5.5}$ – enchimento de vagens e R_6-$R_{8.3}$ – vagens cheias e senescência. SE – sem estresse hídrico, CE – com estresse hídrico

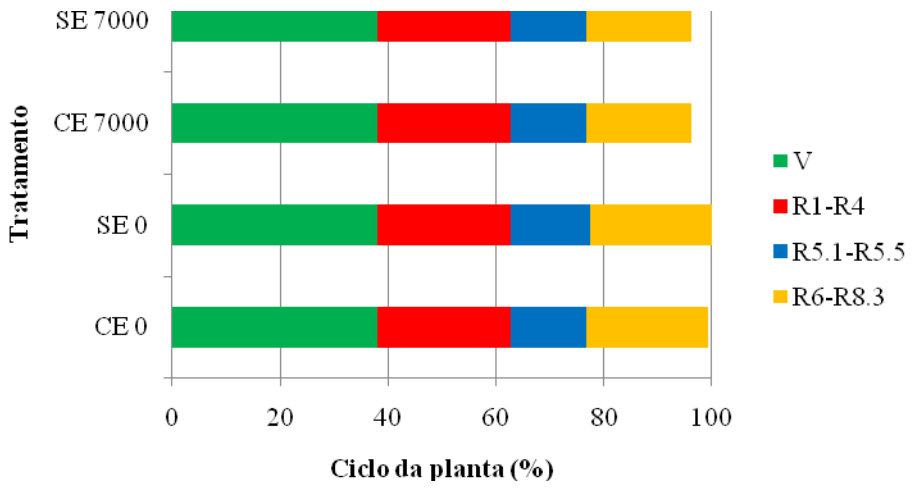


Figura 17 - Porcentagem de redução do ciclo de plantas de soja, cultivar M 7908 RR, em plantas inoculadas com 7000 espécimes de *M. javanica* submetidas ou não a estresse hídrico comparado com plantas não inoculadas (população 0) não submetidas ao estresse hídrico. V – estádio vegetativo, R_1-R_4 – florescimento e formação de vagens, $R_{5.1}$-$R_{5.5}$ – enchimento de vagens e R_6-$R_{8.3}$ – vagens cheias e senescência. SE – sem estresse hídrico, CE – com estresse hídrico

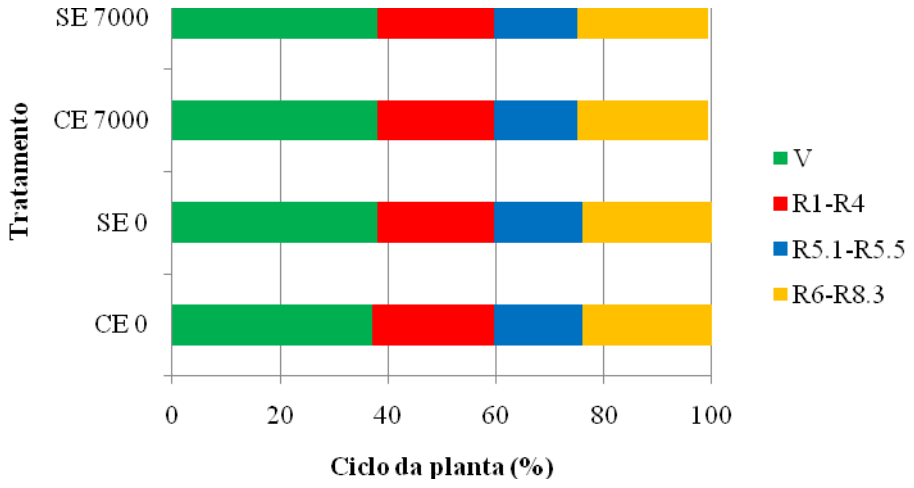


Figura 18 – Porcentagem de redução do ciclo de plantas de soja, cultivar M 7908 RR, em plantas inoculadas com 7000 espécimes de *P. brachyurus* submetidas ou não a estresse hídrico comparado com plantas não inoculadas (população 0) não submetidas ao estresse hídrico. V – estádio vegetativo, R_1-R_4 – florescimento e formação de vagens, $R_{5.1}$-$R_{5.5}$ – enchimento de vagens e R_6-$R_{8.3}$ – vagens cheias e senescência. SE – sem estresse hídrico, CE – com estresse hídrico

Nas figuras 19, 20, 21 e 22 pode-se observar plantas de soja das cultivares TMG-115RR e M 7908 RR submetidas ou não ao tratamento de inoculação com *M. javanica* e *P. brachyurus,* com 116 dias após a semeadura e 102 dias após a inoculação. Como verificado na

avaliação de fenologia, para os dois cultivares inoculados com *M. javanica*, o estádio de senescência foi precocemente alcançado, pois as folhas caíram e as vagens se tornaram amarelas mais rapidamente que nas plantas sem inoculação (Figuras 19 e 21). Por outro lado, não foi possível verificar diferença na senescência das plantas submetidas aos diferentes tratamentos com *P. brachyurus* (Figura 20 e 22) e de estresse hídrico para os dois cultivares.

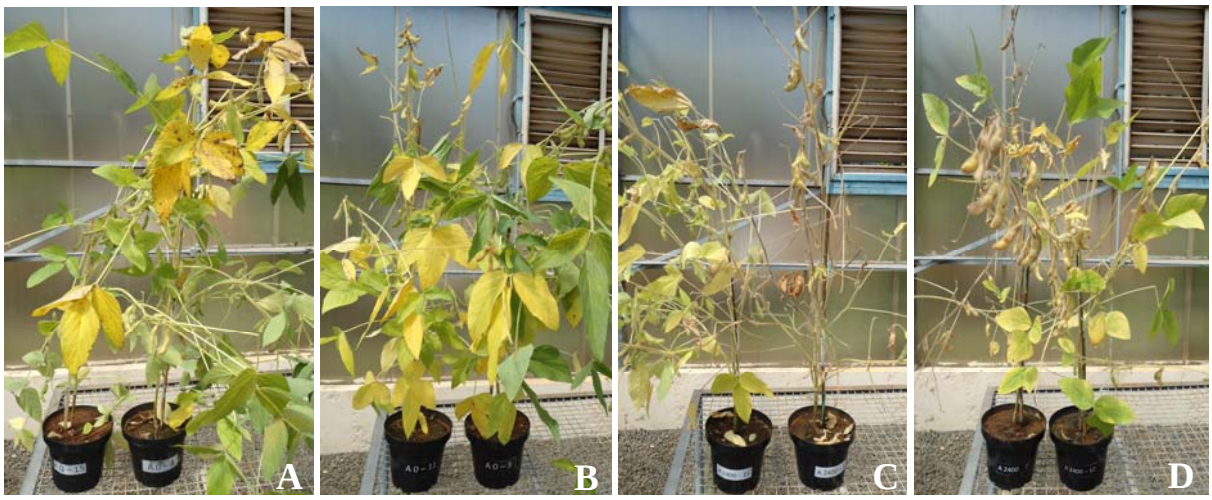


Figura 19 - Plantas de soja, cultivar TMG-115RR, com 116 dias após a semeadura e 102 dias após a inoculação com *Meloidogyne javanica*. A - plantas não inoculadas e sem estresse hídrico, B - plantas não inoculadas e com estresse hídrico, C - plantas inoculadas sem estresse hídrico e D – plantas inoculadas com estresse hídrico

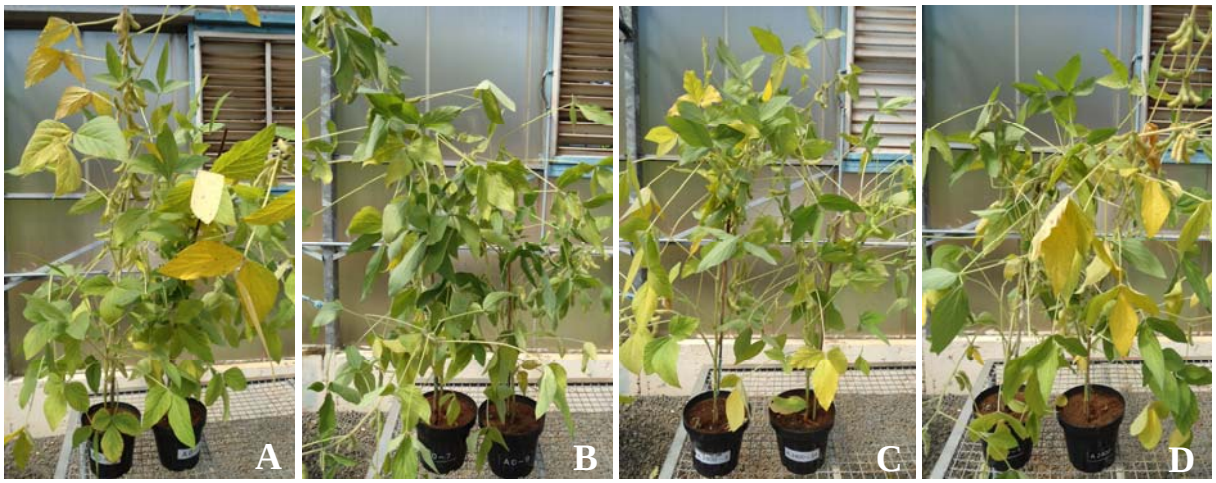


Figura 20 - Plantas de soja, cultivar TMG-115RR, com 116 dias após a semeadura e 102 dias após a inoculação com *Pratylenchus brachyurus*. A - plantas não inoculadas e sem estresse hídrico, B - plantas não inoculadas e com estresse hídrico, C - plantas inoculadas sem estresse hídrico e D – plantas inoculadas com estresse hídrico

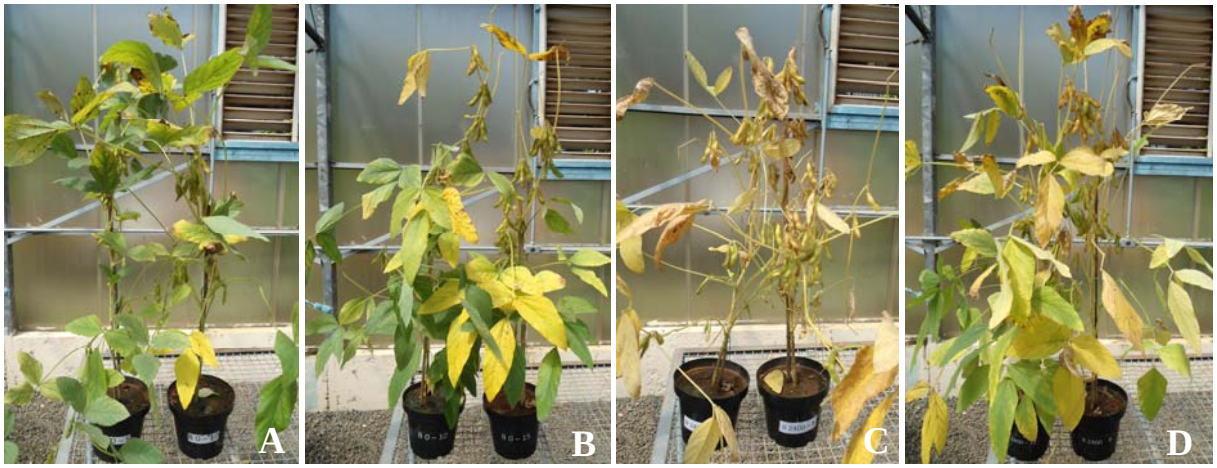


Figura 21 - Plantas de soja, cultivar M 7908 RR, com 116 dias após a semeadura e 102 dias após a inoculação com *Meloidogyne javanica*. A - plantas não inoculadas e sem estresse hídrico, B - plantas não inoculadas e com estresse hídrico, C - plantas inoculadas sem estresse hídrico e D – plantas inoculadas com estresse hídrico

Figura 22 - Plantas de soja, cultivar M 7908 RR, com 116 dias após a semeadura e 102 dias após a inoculação com *Pratylenchus brachyurus*. A - plantas não inoculadas e sem estresse hídrico, B - plantas não inoculadas e com estresse hídrico, C - plantas inoculadas sem estresse hídrico e D – plantas inoculadas com estresse hídrico

Durante todo o desenvolvimento das plantas, foram observados alguns efeitos fisiológicos exclusivamente nas plantas inoculadas com nematoides, principalmente para aquelas inoculas com *M. javanica*. Foram observados nas folhas novas de plantas em estádio de R_1-R_3, sintomas de clorose generalizada (Figuras 23A e 23C) e nas folhas mais velhas, sintomas de clorose começando nos bordos foliares migrando para a nervura central (Figuras 23B, 23D e 23E). Muitos trabalhos relataram a clorose nas folhas como sendo o principal

sintoma causado na parte aérea das plantas infectadas (LORDELLO, 1988; SHARMA; RODRÍGUEZ, 1982; TIHOHOD, 2000; SANTOS et al., 2001; BERKE et al., 2005; SHARMA et al., 2005).

Parte das alterações nas colorações das plantas parasitadas está possívelmente relacionada com a absorção e translocação de nitrogênio. Essa hipótese pode ser reforçada por Carneiro (2000), que demonstrou que ocorreu acúmulo de maiores quantidades de nutrientes nas raízes que na parte aérea no período de 40 dias após a inoculação de plantas de soja por *M. javanica* e *M. incógnita* raça 3, coincidindo com a época em que foram verificadas as maiores variações na coloração das folhas da cultivar Embrapa 133. Além disso, a deficiência de nitrogênio pode ter sido devida à baixa nodulação das plantas infectadas (KOENNING; BARKER, 1995).

Figura 23 - Sintomas nas folhas de plantas inoculadas com nematoides. Folhas novas apresentando clorose generalizada (A, C) e folhas desenvolvidas com clorose migrando das bordas para a nervura central (B, D e E)

Além dos sintomas verificados nas folhas, foi observado abortamento de flores e morte de vagens em início de desenvolvimento (Figuras 24A e 24C), formação de vagens vazias (Figuras 24D, 24E e 24F) e formação de vagens que atingiram a coloração amarela precocemente com sementes mal formadas em seu interior (Figuras 24B e 24F).

Figura 24 - Sintomas nas flores e vagens de plantas inoculadas com nematoides. Abortamento de flores e gemas reprodutivas (A), abortamento de vagens (C), formação de vagens vazias (D, E e F) e formação de vagens com sementes pouco desenvolvidas em vagens que atingiram precocemente a coloração amarela (B e F)

2.3.3.2 Avaliações de nematoides, desempenho de plantas e de sementes

Nas figuras 25 e 26 estão apresentados os sintomas típicos provocados nas raízes para os dois nematoides em estudo. Observou-se que nas raízes inoculadas com *M. javanica* houve a formação de galhas típicas para os dois cultivares estudados, principalmente na região superficial de raízes, próximo ao colo da planta, sendo mais visível para a cultivar TMG-115RR (Figura 25B) que para a cultivar M 7908 RR (Figura 26B). Para *P. brachyurus*, as raízes de ambas as cultivares ficaram mais escurecidas em relação as raízes das plantas não

inoculadas devido a formação de galerias provocadas por este nematoide (Figuras 25C e 26C). Essa expressão de sintomas nas raízes ocorreu em todas as plantas inoculadas, independentemente dos tratamentos de estresse hídrico.

Figura 25 - Raízes de plantas de soja (cultivar TMG-115RR) de plantas não inoculadas (A), de plantas inoculadas com *Meloidogyne javanica* (B) e *Pratylenchus brachyurus* (C)

Figura 26 - Raízes de plantas de soja (cultivar M 7908 RR) de plantas não inoculadas (A), de plantas inoculadas com *Meloidogyne javanica* (B) e *Pratylenchus brachyurus* (C)

2.3.3.2.1 Meloidogyne javanica

Na tabela 9 estão apresentados os resultados de massa fresca de raiz, população final e fator de reprodução, considerando apenas nematoides e nematoides mais ovos, de *M. javanica* para todos os tratamentos testados para os dois cultivares. A menor massa de matéria fresca de raiz foi verificada para os tratamentos sem inoculação de nematoide para os dois cultivares, independentemente do estresse hídrico.

Em infestações com *Meloidogyne javanica* são geralmente verificados maiores massas de raízes em plantas inoculadas com nematoides que em plantas sem a presença deste. Explica-se isso pela formação de galhas nas raízes finas e, principalmente, na raiz primária, onde ocorre a formação de um conglomerado (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Tais malformações, quando volumosas, muitas vezes compensam as reduções na massa de raízes devido ao parasitismo (FERRAZ; LORDELLO, 1982).

Apesar de não ter sido observada diferença estatística, a maior população final de nematoides e fator de reprodução para as duas cultivares foi verificada para as plantas inoculadas e submetidas ao estresse hídrico (Tabela 9). Assim, é possível concluir que a indução de estresse hídrico nas fases de $R_{5.1}$-$R_{5.2}$ e nas fase de senescência (R_7 até o final do ciclo) pouco favoreceu o parasitismo e a multiplicação de *M. javanica* (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados de massa de matéria fresca de raiz em gramas (MR), população final (PF) e fator de reprodução (FR) considerando apenas formas móveis do nematóide, e população final (PF) e fator de reprodução (FR) considerando formas móveis e ovos de *M. javanica* em plantas de soja com (C) e sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides

Cult.	**Pop.**	**MR**		**PF**		**FR**		**PF (+ovos)**		**FR (+ovos)**	
		C	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**
TMG-115RR	**0**	54,1 Ab	55,6 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	7000	73,8 Aa	84,9 Aa	1048467 Aa	883245 Aa	149,8 Aa	126,2 Aa	8812207 Aa	7922821 Aa	1258,9 Aa	1131,8 Aa
	CV	13,59		27,12		23,41		38,71		38,68	
M 7908 RR	**0**	37,4 Ab	37,5 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	7000	47,1 Aa	42,4 Aa	492599 Aa	456937 Aa	70,4 Aa	65,3 Aa	2871530 Aa	2760863 Aa	410,2 Aa	394,4 Aa
	CV	11,48		59,60		58,80		58,58		58,45	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a cultivar TMG-115RR nas avaliações de desenvolvimento de planta e produção, observou-se maiores números de vagens, de sementes total, de sementes por vagens e maior massa de matéria seca de sementes para os dois tratamentos de estresse hídrico e maior massa de 100 sementes para o tratamento com estresse hídrico e maior massa seca de parte aérea para o tratamento sem estresse em plantas sem a presença de nematoides nas raízes em relação as plantas inoculadas (Tabela 10). Para a cultivar M 7908 RR, foi observado maior número de sementes por vagem e maior massa de matéria seca de sementes para aquelas produzidas em plantas sem a presença do nematoide com estresse hídrico (Tabela 10).

As expressivas reduções no número de vagens, número de sementes, massa seca de 100 sementes e de massa seca de parte aérea para as plantas inoculadas corroboram os resultados obtidos por Asmus e Ferraz (2001) e evidenciam, mais uma vez, o grande potencial de dano de *M. javanica* para a cultura da soja.

A queda nos parâmetros de produção observada neste experimento, principalmente para a cultivar TMG-115RR, não ocorreu no experimento I, em que a população mais alta testada foi de 2400 nematoides. Isso demonstra que a presença de altas populações de *M. javanica* (7000 nematoides) em raízes de soja prejudica o desenvolvimento da planta e, consequentemente, a produção de sementes. Porém, sabe-se que o prejuízo na produção depende de vários fatores, entre eles, cultivar, idade da planta, espécie e raça de nematoide e condições ambientais (BARKER; OLTHOF, 1976; ASMUS; FERRAZ, 2001; ABAWI; BARKER, 1984).

Entre os efeitos prejudiciais da presença do nematoide ao desenvolvimento das plantas e produtividade é possível destacar o abortamento ou a produção de menor número de flores (relacionado ao menor número de vagens), a maior quantidade de produção de vagens vazias (Tabela 10) e a deficiência no processo de assimilação e transporte interno de solutos e de fotoassimilados, demonstrado pela redução do número de sementes, na massa de 100 sementes e na massa seca de parte aérea das plantas (Tabela 10). A menor massa de sementes e de parte aérea pode ser um indicativo de que os nematoides em desenvolvimento nas raízes possam atuar como eficientes drenos metabólicos (CARNEIRO; MAZZAFERA; FERRAZ, 1999; CARNEIRO, 2000; CIRRINICIONE; TEFFT; SPRINGER, 2009), prejudicando o processo de formação e reduzindo a massa de sementes.

Gonçalves et al. (1995) destacaram que a diminuição da área foliar, deficiência mineral, murchamento temporário durante o período mais quente do dia e baixa produtividade são conseqüências de raízes danificadas, características de plantas atacadas por nematoides. Uma vez que os nutrientes absorvidos pelas raízes são levados a parte aérea via xilema, seria

esperado que qualquer alteração no fluxo da água pudesse também acarretar em problemas fisiológicos. Assim, dependendo do nematoide e da população que esteja colonizando as raízes de uma planta, pode haver redução na absorção de nutrientes pela própria redução do sistema radicular, como também pela disfunção ocasionada no mesmo. Como conseqüência, isso pode levar a reduções no crescimento da planta e na produtividade.

Analisando os dados dos dois cultivares, observa-se para a cultivar TMG-115RR maiores perdas de produção em comparação com o M 7908 RR. Isso pode ter ocorrido pelo fato da população final de nematoides na cultivar TMG-115RR ter sido consideravelmente maior que na cultivar M 7908 RR (Tabela 9). Assim, a maior quantidade de nematoides nas plantas pode ter afetado de forma mais severa o desenvolvimento e a produção desta. Além disso, essa cultivar pode tolerar mais a multiplicação e o efeito da presença do nematoide na sua fisiologia e na sua produtividade, pois, sabe-se que diferentes cultivares respondem de forma diferente à presença de nematoides.

Em relação aos tratamentos de estresse hídrico, foi verificado para a cultivar TMG-115RR redução no número de vagens para ambos os tratamentos de população inicial, no número de sementes para o tratamento de 7000 nematoides e no número de sementes por vagem para o tratamento sem inoculação nas plantas que não foram submetidas ao estresse hídrico em relação às plantas submetidas ao estresse (Tabela 10).

Para a cultivar M 7908 RR foi verificado aumento do número de sementes e de vagens nas plantas submetidas ao estresse hídrico para o tratamento sem inoculação (Tabela 10).

De maneira geral, a deficiência hídrica exerce influências negativas sobre as plantas e, na maioria dos casos, seus danos são mensurados mediante o acompanhamento dos processos que estão relacionados ao crescimento, como as alterações que ocorrem em nível morfológico e no acúmulo de biomassa, por parte dos distintos órgãos vegetais (CARVALHO, 2004). Porém, como neste caso o estresse hídrico provocado foi muito leve e apenas na fase de enchimento das vagens e senescência, esse pode não ter sido suficiente para provocar queda na produtividade e, além disso, pode ter favorecido a produtividade das plantas estressadas devido à remobilização de carbono presente nos outros tecidos da planta para a semente.

Yang et al. (2001), trabalhando com plantas de trigo, constataram que moderado estresse hídrico promove a remobilização do carbono produzido antes da antese armazenados na haste e na bainha das plantas para os grãos. Quanto mais rápida e severa for a indução do estresse hídrico, até um nível em que a planta tolere, mais rapidamente o carbono é realocado dos tecidos da planta para os grãos. Dessa forma, a massa de sementes e a produtividade foram maiores para as plantas submetidas a um estresse moderado.

Tabela 10 - Número de vagens (NV), número de vagens vazias (VV), número de sementes total (NS), número de sementes por vagens (NS/V), massa de matéria seca de sementes (MS), massa de 100 sementes (M100S) e massa de matéria seca de parte aérea por planta (MPA), em gramas, em plantas de soja com (C) e sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*M. javanica)*

Cultivar	**Pop.**	**NV**		**VV**		**NS**		**NS/V**		**MS**		**M100S**		**MPA**	
		C	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**
TMG-115RR	**0**	80 Aa	63 Ba	5 Ab	2 Ab	185 Aa	185 Aa	2,2 Ba	2,8 Aa	26,1 Aa	27,6 Aa	14,1 Aa	14,9Aa	27,5 Aa	27,9 Aa
	7000	57Ab	44 Bb	12 Aa	13Aa	110 Ab	79 Bb	1,6 Ab	1,4 Ab	11,4 Ab	10,1 Ab	10,4 Ab	12,8 Aa	23,9 Aa	21,9 Ab
	CV	10,84		23,35		12,03		15,46		10,18		12,70		7,01	
M 7908 RR	**0**	48 Aa	47 Aa	5 Ba	9 Aa	101 Aa	90 Aa	1,9 Aa	1,6 Ba	17,0 Aa	15,9 Aa	16,8 Aa	17,6 Aa	15,8Aa	15,2 Aa
	7000	45 Aa	43 Aa	8 Ba	12 Aa	87 Aa	78 Aa	1,6 Ab	1,4 Aa	14,4 Ab	13,1 Aa	16,5 Aa	16,7 Aa	16,0 Aa	14,1 Aa
	CV	25,43		22,72		15,59		7,80		19,90		7,95		18,60	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De maneira geral, as sementes provenientes das plantas da cultivar TMG-115RR inoculadas com *M. javanica* apresentaram menor potencial fisiológico do que aquelas produzidas em plantas sem nematoides. Os dados de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, emergência de plântulas em campo (Tabela 11) e tetrazólio (Tabela 12) classificaram as sementes produzidas em plantas sem nematoide, com e sem estresse hídrico, como as de melhor potencial fisiológico. Além disso, a ocorrência de sementes esverdeadas nos tratamentos com nematoides foi mais elevada que para as plantas não inoculadas. Dessa forma, observa-se que a redução no potencial fisiológico das sementes provenientes de plantas inoculadas pode ter sido devido ao aumento da ocorrência de sementes esverdeadas, visto que estas sementes tem um menor potencial fisiológico (COSTA et al., 2001; PÁDUA et al., 2005, 2009a; ZORATO et al., 2007; CICERO; VAN SCHOOR; JALINK, 2009; RANGEL et al., 2011) em relação às sementes amarelas ou devido à ação do nematoide interferindo no processo de formação das sementes, resultando em sementes de menor qualidade.

O impacto do pigmento verde sobre a qualidade fisiológica é maior quanto mais elevado for o índice de sementes esverdeadas e quanto maior a intensidade da tonalidade do verde incidindo nos cotilédones das sementes presentes no lote (ZORATO, 2003).

A partir das análises dos dados obtidos pelo SVIS (Tabela 13), as sementes de plantas da cultivar TMG-115RR sem a presença de *M. javanica* tiveram maior índice de vigor, de crescimento e comprimento de plântulas em relação às sementes de plantas inoculadas para o tratamento sem estresse hídrico.

Observa-se que a submissão das plantas ao estresse hídrico não afetou de forma importante o potencial fisiológico destas.

Assim, todos os testes de potencial fisiológico confirmaram que as plantas de soja da cultivar TMG115-RR quando inoculadas com 7000 nematoides produziram maior número de sementes esverdeadas e sementes de menor potencial fisiológico.

Para a cultivar M 7908 RR, foi possível verificar aumento na ocorrência de sementes esverdeadas apenas para o tratamento de plantas inoculadas, com estresse hídrico, em relação as não inoculadas (Tabela 11). Além disso, foi verificado para as sementes provenientes de plantas sem estresse hídrico e sem nematoides, menores valores de condutividade elétrica, de sementes na classe 6 avaliados pelo teste de tetrazólio e de sementes com anomalias embrionárias e maiores porcentagens de sementes na classe 1 avaliadas pelo teste de tetrazólio em relação às plantas

inoculadas (Tabela 12). Porém, para os outros testes de avaliação do potencial fisiológico, inclusive o SVIS, não foi verificado efeito do *M. javanica* na qualidade de sementes (Tabelas 11 e 13).

As anomalias embrionárias podem ter ocorrido pela presença de *M. javanica* nas plantas. São consideradas anomalias embrionárias quando são constatados três ou mais cotilédones, quando se observa a ocorrência de cotilédones deformados ou dobrados ou quando o eixo embrionário se desenvolveu em local inadequado (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998). Entretanto, se estas anomalias não afetarem tecidos vitais das sementes, estas podem originar plântulas normais e, portanto, devem ser computadas no cálculo de sementes viáveis.

Em relação ao tratamento de estrese hídrico, foi verificado maior porcentagem de sementes esverdeadas apenas nas plantas submetidas ao tratamento com estresse hídrico e inoculadas em relação às não submetidas ao estrese hídrico (Tabela 11). Neste caso, para esta cultivar, o estresse hídrico pode ter induzido a produção de sementes esverdeadas, mas não a ponto de causar redução no potencial fisiológico destas.

Tabela 11 - Teor de água (TA), germinação (G), envelhecimento acelerado (EA) emergência de plântulas em areia (EPA) e ocorrência de sementes esverdeada (SE), em porcentagem, e condutividade elétrica (CE), em µS cm^{-1} g^{-1}, de sementes de soja produzidas em plantas com (C) e sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*M. javanica)*

Cultivar	Pop.	TA		G		EA		CE		EPA		SE	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	0	10,3	10,5	92 Aa	98 Aa	93 Aa	96 Aa	38,42 Aa	41,45 Ab	93 Aa	97 Aa	0 Ab	1 Ab
	7000	9,1	9,0	79 Ab	86 Ab	84 Ab	76 Ab	40,30 Ba	54,93 Aa	86 Aa	76 Bb	9 Aa	10 Aa
	CV	-		7,63		3,95		13,66		5,75		66,01	
M 7908 RR	0	8,9	9,1	93 Aa	97 Aa	95 Aa	98 Aa	48,68 Aa	44,70 Ab	98 Aa	98 Aa	8 Ab	8 Aa
	7000	8,6	8,8	94 Aa	94 Aa	92 Aa	94 Aa	47,43 Aa	53,37 Aa	95 Aa	98 Aa	14 Aa	6 Ba
	CV	-		3,36		6,62		8,68		5,43		31,38	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 12 - Notas atribuídas às sementes após avaliação pelo teste de tetrazólio, em porcentagem, de sementes de soja produzidas em plantas com (C) e sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*M. javanica)*. Nota 1: sementes sem danos, notas 2-3: sementes com danos leves que não afetaram o vigor e viabilidade, nota 4-5: sementes com danos severos que afetaram o vigor e não a viabilidade, nota 6: sementes com danos que afetaram a viabilidade e AE: anomalias embrionárias

Cultivar	Pop.	1		2 -3		4-5		6-U		6-P		6-M		AE	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	0	98 Aa	94 Aa	2 Aa	4 Aa	0	0	0 Ab	1 Ab	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Ab	0 Aa	1 Aa
	7000	89 Ab	90 Aa	3 Aa	2 Aa	0	0	5 Aa	4 Aa	2 Aa	0 Aa	1 Aa	2 Aa	0 Ba	2 Aa
	CV	6,06		36,36		-		33,33		47,10		32,99		46,65	
M 7908 RR	0	90 Aa	94 Aa	4 Aa	4 Aa	0	0	0	0	2 Aa	1 Aa	2 Aa	0 Ab	1 Ab	1 Ab
	7000	90 Aa	82 Ab	1 Bb	5 Aa	0	0	0	0	0 Aa	0 Aa	1 Aa	4 Aa	8 Aa	9 Aa
	CV	5,50		36,36		-		-		87,28		55,54		52,98	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 13 - Índice de vigor (IV), índice de crescimento (IC), índice de uniformidade (IU) e comprimento de plântulas (CP), em cm, avaliados por meio do SVIS, de sementes de soja produzidas em plantas com (C) e sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*M. javanica)*

Cultivar	**Pop.**	**IV**		**IC**		**IU**		**CP**	
		C	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**
TMG-115RR	**0**	611,8 Aa	681,3 Aa	517,5 Aa	600,3 Aa	850,8 Aa	871,3 Aa	4,8 Aa	5,9 Aa
	7000	592,3 Aa	516,3 Ab	504,8 Aa	392,0 Ab	798,5 Aa	807,3 Aa	4,4 Aa	3,2 Ab
	CV	8,84		21,22		5,88		18,49	
M 7908 RR	**0**	770,0 Aa	803,0 Aa	724,8 Aa	767,3 Aa	876,8 Aa	886,8 Aa	7,3 Aa	7,8 Aa
	7000	724,3 Aa	775,8 Aa	655,0 Aa	727,5 Aa	887,3 Aa	890,0 Aa	6,5 Aa	7,2 Aa
	CV	11,85		16,72		3,12		9,03	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.3.2.2 Pratylenchus brachyurus

Após a colheita das sementes e avaliação das raízes das plantas de soja inoculadas ou não com *P. brachyurus*, foi verificado maior massa de raiz para o tratamento sem nematoide e sem estresse hídrico para a cultivar TMG-115RR (Tabela 14). Para a cultivar M 7908 RR não foi observada alteração na massa de raízes apesar de ter sido verificada alta população de nematoides ao final do ciclo das plantas inoculadas (Tabela 14). Em todos os casos, para ambas as cultivares, a população final de nematoides e o fator de reprodução, considerando ou não ovos, foi elevada, sendo a cultivar TM-115RR mais favorável a multiplicação dos nematoides com fatores de reprodução acima de 20 (Tabela 14). Esta maior capacidade de reprodução de *P. brachyurus* na cultivar TMG-115RR já tinha sido anteriormente verificada no experimento de resistência de cultivares (experimento II).

Em relação ao tratamento de estresse hídrico, foi verificado para a cultivar TMG-115RR maior população final e fator de reprodução, considerando ou não ovos, apenas nas plantas inoculadas com nematoides e não submetidas ao estresse hídrico em relação as plantas estressadas (Tabela 14). Para a cultivar M 7908 RR não foram observadas diferenças na multiplicação dos nematoides para os tratamentos de estresse hídrico, porém, em valores absolutos, estes foram mais elevados nas plantas as quais não foram submetidas ao estresse. Assim, percebe-se que para as duas cultivares, principalmente para a TMG-115RR, a submissão das plantas ao estresse hídrico prejudicou o parasitismo, reduzindo a população de nematoides ao final do ciclo dessass plantas em relação as quais não foram submetidas ao estresse hídrico.

A redução da população de nematoides em condições de estresse hídrico provavelmente ocorreu devido ao hábito migrador de *P. brachyurus*. Os nematoides que vivem dentro de raízes, como é o caso de *M. javanica*, possuem o privilégio de proteção ótima à estresses ambientais enquanto a viabilidade do hospedeiro persistir. Contudo, os nematoides ou estádios de nematoides que não vivem dentro do hospedeiro são protegidos pela umidade do solo, mas ficam sujeitos à desidratação e morte rápida enquanto o solo perde umidade (CHRISTIE, 1959; RITZINGER; FANCELLI; RITZINGER, 2010). A umidade do solo é necessária para muitos processos vitais de *Pratylenchus spp.* e é um dos mais importantes fatores que influenciam as populações (GOULART, 2008).

Tabela 14 - Resultados de massa de matéria fresca de raiz em gramas (MR), população final (PF) e fator de reprodução (FR) considerando apenas formas móveis do nematóide, e população final (PF) e fator de reprodução (FR) considerando formas móveis e ovos de *P.brachyurus* em plantas de soja com (C) e sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides

Cultivar	**Pop.**	**MR**		**PF**		**FR**		**PF (+ovos)**		**FR (+ovos)**	
		C	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**
TMG-115RR	**0**	45,7 Ba	78,8 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	7000	53,8 Aa	59,3 Aa	152679 Ba	193545 Aa	21,8 Ba	27,7 Aa	204600 Ba	266585 Aa	29,2 Ba	38,1 Aa
	CV	20,32		35,60		34,33		39,74		38,66	
M 7908 RR	**0**	39,4 Aa	39,8 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	7000	37,1 Aa	34,9 Aa	75267 Aa	88937 Aa	10,8 Aa	12,7 Aa	96778 Aa	109579 Aa	13,8 Aa	15,7 Aa
	CV	14,43		50,77		46,91		49,82		46,70	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação às avaliações de produção de vagens, sementes e parte aérea (Tabela 15), verificou-se para a cultivar TMG115-RR, maior número de sementes e massa de matéria seca de sementes para as plantas não inoculadas em relação às inoculadas no tratamento sem estresse hídrico. Porém, para a massa de 100 sementes foram observados maiores valores para aquelas provenientes de plantas com nematoides no tratamento sem estresse hídrico (Tabela 15). A menor massa de 100 sementes nas plantas não inoculadas pode ser devido ao maior número de sementes nestes tratamentos (51 sementes a mais que no tratamento com nematoides).

A redução no desenvolvimento da parte aérea das plantas e da produção é conseqüência dos sintomas associados à *P. brachyurus*, o que inclui a ocorrência de lesões escurecidas ao longo das raízes, provocando atrofiamento das mesmas, chegando a comprometer a absorção de água e de nutrientes (DINARDO-MIRANDA et al., 2003; LORDELLO, 1988).

Em trabalhos de campo, também tem sido observado redução na massa de sementes em áreas infectadas por nematoides. Silva e Pereira (2003) observaram redução de 34 % e de 17 % nas cultivares Tucano e Uirapuru, respectivamente, para as plantas dentro de áreas de reboleira em relação àquelas localizadas fora.

Para a cultivar M 7908 RR, apesar de ter sido verificada numericamente maior produção de vagens, de sementes e maior massa de parte aérea, não foram observadas diferenças entre os tratamentos de população inicial independentemente do estresse hídrico (Tabela 15).

Diferente do observado para o experimento com *M. javanica*, para os tratamentos de estresse hídrico, observou-se menor número de vagens, número de sementes e massa de matéria seca de sementes para as plantas do tratamento sem nematoides com estresse hídrico em relação às sem estresse hídrico (Tabela 15) para a cultivar TMG115-RR. Para a massa de 100 sementes foi observado menor valor para as plantas submetidas ao estresse hídrico e a inoculação de nematoides em relação às não inoculadas. Para a cultivar M 7908 RR foi observado queda no número de vagens, número de sementes e massa de matéria seca de sementes nas plantas sem inoculação submetidas ao estresse hídrico em relação às não submetidas (Tabela 15).

Tabela 15 - Número de vagens (NV), número de vagens vazias (VV), número de sementes por planta (NS), número de sementes por vagens (NS/V), massa de matéria seca de sementes (MS), massa de 100 sementes (M100S) e massa de matéria seca de parte aérea por planta (MPA), em gramas, em plantas de soja com (C) e sem (S) estrese hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*P. brachyurus)*

Cultivar	Pop.	NV		VV		NS		NS/V		MS		M100s		MPA	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	**0**	65 Aa	74 Aa	2 Aa	1 Aa	150 Ba	184 Aa	2,2 Aa	2,5 Aa	24,3 Ba	29,2 Aa	16,2 Aa	15,9 Ab	19,9 Ba	27,4 Aa
	7000	63 Aa	57 Aa	1 Aa	1 Aa	149 Aa	133 Ab	2,3 Aa	2,3 Aa	23,5 Aa	23,9 Ab	15,8 Ba	18,1 Aa	20,5 Aa	23,2 Aa
	CV	14,33		77,80		9,07		7,05		8,57		5,53		11,03	
M 7908 RR	**0**	25 Ba	35 Aa	0 Ba	2 Aa	55 Ba	78 Aa	2,2 Aa	2,1 Aa	11,5 Ba	14,9 Aa	20,7 Aa	19,0 Aa	12,1 Aa	15,0 Aa
	7000	26 Aa	29 Aa	1 Aa	1 Aa	60 Aa	62 Aa	2,3 Aa	2,1 Aa	11,5 Aa	12,6 Aa	19,3 Aa	20,4 Aa	11,3 Aa	13,3 Aa
	CV	28,76		72,9		18,42		5,74		15,99		11,02		10,77	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir dos resultados dos testes para avaliar o potencial fisiológico de sementes, foi observado para a cultivar TMG115-RR no tratamento sem nematoide, maior germinação e maior germinação após o envelhecimento acelerado em relação aos tratamentos com nematoides independentemente do estresse hídrico em que as plantas foram submetidas (Tabela 16). Foi verificado menor condutividade elétrica apenas para as sementes provenientes de plantas sem estresse hídrico e sem nematoides em relação às estressadas (Tabela 16). A redução no potencial fisiológico de sementes provenientes de plantas com nematoides não foi devido a maior ocorrência de sementes esverdeadas, visto que não houve diferença na quantidade destas sementes entre os tratamentos testados para esta cultivar.

Por meio do teste de tetrazólio observou-se maior porcentagem de sementes na classe 1 para as que foram submetidas ao estresse hídrico em relação àquelas sem estresse para o tratamento de inoculação de nematoides (Tabela 17). A redução da porcentagem de sementes na classe 1 para este tratamento foi devido ao aumento no número de sementes na classe 2 para este mesmo tratamento (12%) (Tabela 17). Para as avaliações por meio do SVIS (Tabela 18) para a cultivar TMG115-RR, foi possível observar maior índice de vigor e índice de crescimento nos tratamentos de plantas inoculadas sem estrese hídrico em relação as plantas estressadas. O mesmo foi verificado para comprimento de plântulas para as sementes provenientes de plantas submetidas ao estrese hídrico independentemente da população inicial de nematoides.

Para a cultivar M 7908 RR não foram observadas diferenças marcantes no potencial fisiológico das sementes entre os tratamentos de nematoides e estresse hídrico quando avaliado por meio dos testes de potencial fisiológico (Tabela 16) e tetrazólio (Tabela 17). Nas avaliações por meio do SVIS, foi verificado maior índice de vigor e o índice de crescimento para as sementes provenientes de plantas sem nematoide em relação às plantas com nematoides para o mesmo tratamento sem estresse hídrico (Tabela 18).

Tabela 16 - Teor de água (TA), germinação (G), envelhecimento acelerado (EA) emergência de plântulas em areia (EPA) e ocorrência de sementes esverdeada (SE), em porcentagem, e condutividade elétrica (CE), em µS cm^{-1} g^{-1}, de sementes de soja produzidas em plantas com (C) e sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*P. brachyurus)*

Cultivar	Pop.	TA		G		EA		CE		EPA		SE	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	0	12,0	11,5	95 Aa	97 Aa	99 Aa	98 Aa	41,04 Aa	29,49 Ba	99 Aa	97 Aa	2 Aa	2 Aa
	7000	10,8	11,9	90 Ab	90 Ab	93 Ab	93 Ab	33.32 Aa	35,77 Aa	96 Aa	94 Aa	2 Aa	3 Aa
	CV	-		3,03		3,06		11,66		3,77		50,84	
M 7908 RR	0	9,2	9,8	98 Aa	99 Aa	98 Aa	95 Aa	50,72 Aa	47,67 Aa	99 Aa	96 Aa	9 Aa	6Ab
	7000	9,0	9,1	100 Aa	96 Aa	98 Aa	98 Aa	46,33 Aa	49.21 Aa	99 Aa	97 Aa	10 Aa	12 Aa
	CV	-		2,43		2,92		17,92		2,24		24,34	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 17 - Notas atribuídas as sementes após avaliação pelo teste de tetrazólio, em porcentagem, de sementes produzidas em plantas não inoculadas e inoculadas com 7000 nematoides (*P. brachyurus)* com (C) e sem (S) estresse hídrico. Nota 1: sementes sem danos, notas 2-3: sementes com danos leves que não afetaram o vigor e viabilidade, nota 4-5: sementes com danos severos que afetaram o vigor e não a viabilidade, nota 6: sementes com danos que afetaram a viabilidade e AE: anomalias embrionárias

Cultivar	Pop.	1		2 -3		4-5		6-U		6-P		6-M		AE	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	0	96 Aa	97 Aa	4 Aa	3 Ab	0	0	0 Aa	0 Aa	0	0	0 Aa	0 Aa	0	0
	7000	96 Aa	88 Ba	1 Ba	12 Aa	0	0	2 Aa	0 Aa	0	0	1 Aa	0 Aa	0	0
	CV	4,70		43,30		-		76,90		-		19,04			
M 7908 RR	0	100Aa	96 Aa	0 Ab	3 Aa	0 Aa	1 Aa	0	0	0	0	0	0	0 Aa	0 Aa
	7000	96 Aa	98 Aa	4 Aa	1 Ba	0 Aa	0 Aa	0	0	0	0	0	0	0 Aa	1 Aa
	CV	3,92		48,55		46,18		-		-		-		20,99	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

76

Tabela 18– Índice de vigor (IV), índice de crescimento (IC), índice de uniformidade (IU) e comprimento de plântula (CP), em cm, avaliados por meio do SVIS, de sementes de soja produzidas em plantas com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*P. brachyurus)*

Cultivar	**Pop.**	**IV**		**IC**		**IU**		**CP**	
		C	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**	**C**	**S**
TMG-115RR	**0**	683,0 Aa	730,0 Aa	599,5 Aa	671,5 Aa	880,0 Aa	868,5 Aa	5,9 Ba	7,5 Aa
	7000	642,5 Ba	743,8 Aa	542,5 Ba	688,8 Aa	877,0 Aa	874,3 Aa	5,2 Ba	6,6 Aa
	CV	6,96		6,84		2,85		10,57	
M 7908 RR	**0**	946,8 Aa	936,3 Aa	967,8 Aa	949,0 Aa	899,3 Aa	908,3 Aa	10,6 Aa	10,0 Aa
	7000	922,0 Aa	844,5 Ab	934,5 Aa	829,5 Bb	893,8 Aa	881,5 Aa	9,5 Aa	8,4 Aa
	CV	4,87		6,41		2,62		11,50	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.3.3 Fluorescência de clorofila

2.3.3.3.1 Melodogyne javanica

Os resultados de fluorescência de clorofila e de ocorrência de sementes esverdeadas pelo método visual estão apresentados na tabela 19 e 20. Para o experimento com *M. javanica*, foi verificado, para a cultivar TMG-115RR, maior porcentagem de sementes na classe 0-400 pA para as plantas não inoculadas em relação às inoculadas. As sementes provenientes de plantas inoculadas com o nematoide tiveram maior fluorescência de clorofila nas classes de 400-800 pA, 800-1200 pA e acima de 1200 pA (Tabela 19 e Figura 27). Isso demonstra que, da mesma forma que verificado com a análise visual, as sementes de plantas inoculadas mantiveram maior quantidade de clorofila ao final da maturação em comparação àquelas de plantas não inoculadas. Esta maior quantidade de clorofila está associada, também, à redução no potencial fisiológico das sementes da cultivar TMG-115RR inoculadas com *M. javanica* (Tabelas 11, 12 e 13).

Em relação ao estresse hídrico, não foi verificado efeito deste na retenção de clorofila para a cultivar TMG-115RR no experimento de *M. javanica*.

Em sementes de cenoura, colhidas durante diferentes estádios de maturação, foi observado redução no teor total de clorofila durante a maturação e aumento na germinação das sementes com os menores teores de clorofila (STECKEL; GRAY; ROWSE, 1989). Jalink et al. (1998a) separaram sementes de repolho em três classes de fluorescência de clorofila e verificaram que as sementes da classe de maior fluorescência tiveram menor taxa de germinação e menor vigor (avaliado pelo teste de deterioração controlada) em relação às sementes com baixa e média fluorescência de clorofila.

A degradação de clorofila ou "*degreening*" é um processo importante por reduzir a possibilidade da clorofila produzir radicais livres os quais podem causar danos oxidativos, pois, sabe-se que a deterioração de sementes durante o armazenamento tem sido frequentemente relatada como sendo provocada por radicais livres, os quais causam danos oxidativos às proteínas, ácidos nucléicos e membranas (DE VOS; KRAAK; BINO, 1994; MARCOS FILHO, 2005).

Para a cultivar M 7908 RR, não foi observado efeito da presença do nematoide na fluorescência de clorofila, mesmo que numericamente se tenha observado maior porcentagem de sementes nas classes 400-800 e 800-1200 de fluorescência, nas sementes provenientes de plantas inoculadas (Tabela 19 e Figura 27). Neste caso foi observado efeito do estresse hídrico; para as

plantas submetidas ao estresse ocorreu maior quantidade de sementes com fluorescência de clorofila nas classes de 400-800 pA e 800-1200 pA e menor na classe de 0-400 pA.

Em circunstâncias normais, durante a maturação das sementes, a enzima clorofilase degrada a clorofila em sementes de soja. No entanto, em condições climáticas de deficiência hídrica as sementes podem amadurecer mais rápido do que o habitual, cessando a atividade da enzima antes que toda a clorofila tenha sido degradada (BOHNER, 2003). Pádua et al. (2009a) relataram que plantas de soja submetidas a condições de estresses hídrico e térmico, com início em R_6, produzem altos índices de sementes esverdeadas, de menores tamanhos e massa, com elevado teor de clorofila e baixa atividade de clorofilase, sem variações de ocorrência de sementes verdes nas diferentes partes da planta.

2.3.3.3.2 Pratylenchus brachyurus

Para o experimento de *P. brachyurus* na cultivar TMG-115RR, foi observado maior quantidade de sementes com fluorescência de 0-400 pA e menor quantidade nas classes de 400-800 pA e de 800-1200 pA para as plantas não inoculadas sem estresse hídrico (Tabela 20). Para as plantas com estresse hídrico não foi verificado efeito da presença de nematoides. Além disso, também foi observado maior quantidade de sementes na classe de 0-400 e menores nas classes de 400-800pA e 800-1200 pA nas plantas com estresse hídrico em relação as sem estresse para as plantas inoculadas (Tabela 20 e Figura 28).

Em relação a cultivar M 7908 RR, foi verificado menor quantidade de sementes na classe 0-400 e maior na classe de 400-800 para as plantas não inoculadas com *P. brachyurus* independentemente do tratamento de estresse hídrico (Tabela 20 e Figura 28). Para as classes superiores não foram verificadas diferenças entre os tratamentos de inoculação (Tabela 20). Quando avaliado o estresse hídrico, verificou-se maior ocorrência de sementes na classe de 800-1200 pA para as plantas produzidas sob estresse hídrico para o tratamento de inoculação de 7000 nematoides (Tabela 20).

Tabela 19 – Ocorrência de sementes esverdeadas (SEV) e de sementes em diferentes classes de fluorescência de clorofila, em porcentagem, para os tratamentos de plantas de soja com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*M. javanica)*

Cultivar	Pop.	SEV		0-400 pA		400-800 pA		800-1200 pA		>1200 pA	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	0	0 Ab	1 Ab	81,5 Aa	88,2 Aa	14,9 Ab	8,0 Ab	0,9 Ab	1,8 Ab	2,7 Ab	2,0 Aa
	7000	9 Aa	10 Aa	54,7 Ab	62,1 Ab	31,3 Aa	27,3 Aa	7,5 Aa	6,2 Aa	6,5 Aa	4,4 Aa
	CV	66,01		14,62		27,53		47,52		40,92	
M 7908 RR	0	8 Ab	8 Aa	56,3 Ba	78,0 Aa	37,8 Aa	19,7 Ba	4,7 Aa	0,6 Ba	1,3 Aa	2,4 Aa
	7000	14 Aa	6 Ba	43,5 Ba	67,7 Aa	50,0 Aa	29,3 Ba	5,8 Aa	2,6 Aa	0,8 Aa	0,4 Ab
	CV	31,38		13,14		19,63		36,25		32,92	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 20 – Ocorrência de sementes esverdeadas (SEV) e de sementes em diferentes classes de fluorescência de clorofila, em porcentagem, para os tratamentos de plantas de soja com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*P. brachyurus)*

Cultivar	Pop.	SEV		0-400 pA		400-800 pA		800-1200pA		>1200pA	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	0	2 Aa	2 Aa	87,3 Aa	87,3 Aa	9,8 Aa	7,9 Ab	0,4 Aa	0,8 Ab	2,6 Aa	4,0 Aa
	7000	2 Aa	3 Aa	89,5 Aa	76,0 Bb	7,9 Ba	17,9 Aa	0,8 Ba	1,9 Aa	1,8 Aa	4,2 Aa
CV (%)		50,84		6,7		49,37		45,72		63,99	
M 7908 RR	0	9 Aa	6 Ab	64,3 Aa	74,0 Aa	30,1 Ab	23,9 Ab	3,5 Aa	1,6 Aa	2,1 Aa	0,7 Ba
	7000	10 Aa	12 Aa	33,2 Bb	53,1 Ab	58,9 Aa	43,9 Aa	5,5 Aa	1,5 Ba	2,4 Aa	1,5 Aa
CV (%)		24,34		10,20		19,99		57,92		35,92	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

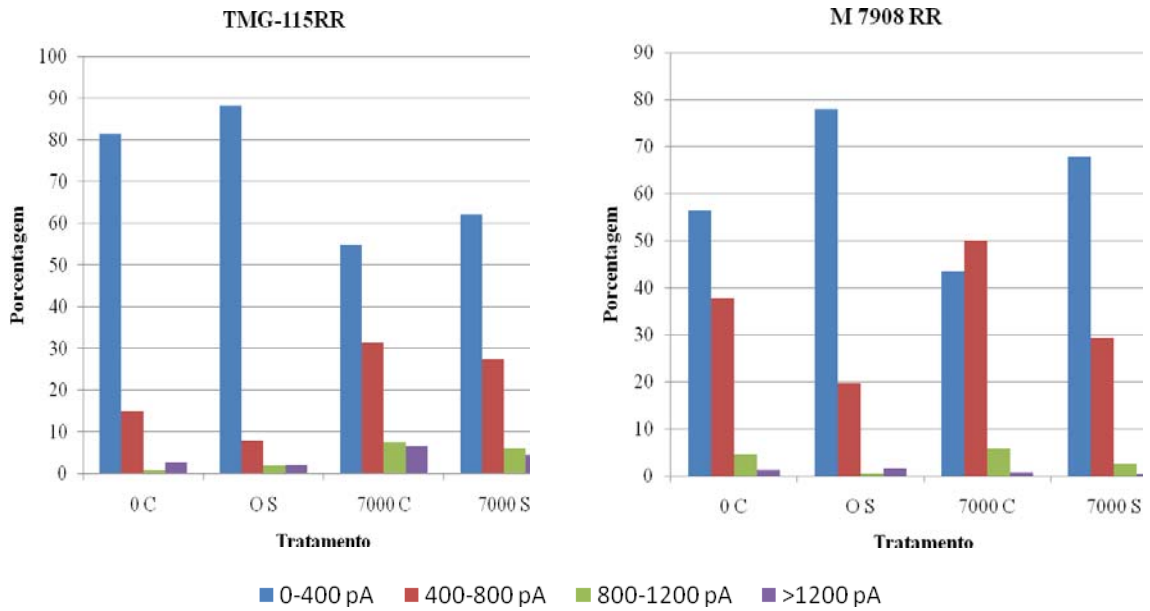


Figura 27 - Porcentagem de sementes de soja em cada classe de fluorescência de clorofila (em pA) provenientes de plantas com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não a inoculação com *Meloidogne javanica*. 0 - planta sem nematoide, 7000 - planta com inoculação de 7000 nematoides, S – plantas sem estresse hídrico e C – plantas com estresse hídrico

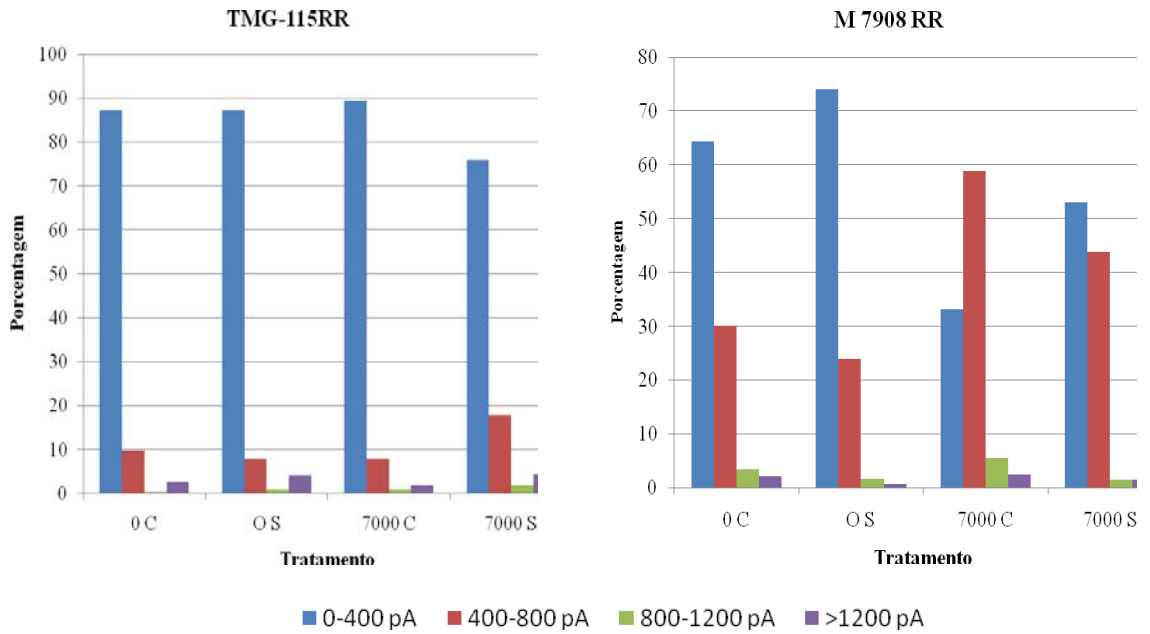


Figura 28 - Porcentagem de sementes de soja em cada classe de fluorescência de clorofila (em pA) provenientes de plantas com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não a inoculação com *Pratylenchus brachyurus*. 0 - planta sem nematoide, 7000 - planta com inoculação de 7000 nematoides, S – plantas sem estresse hídrico e C – plantas com estresse hídrico

2.3.3.4 Citometria de fluxo

2.3.3.4.1 Meloidogyne javanica

Para todos os tratamentos nos dois cultivares, independentemente dos nematoides, os resultados da citometria de fluxo em eixos embrionários resultaram em dois picos: um pico maior no canal de intensidade 50, correspondendo a quantidade de núcleos 2C, e outro entre 70 e 80, correspondendo aos núcleos 4C (Figura 30). De maneira geral, para as sementes secas, foram observados picos mais elevados, referentes aos núcleos 4C, nas sementes provenientes de plantas inoculadas com os nematoides (Figura 30A e Figura 30B). Assim como relatado para sementes de pimentão (LANTERI et al., 1993, 1996), foi observado em sementes secas, as quais ainda não iniciaram o processo de germinação, maior quantidade de núcleos em processo G_1 de divisão celular (2C) e apenas uma porcentagem muito pequena de núcleos na fase G_2 = 4C (3 % a 6 %). Por outro lado, para as sementes hidratadas foi observada maior quantidade de núcleos 4C nas sementes que não foram produzidas em plantas com a presença do nematoide (Figura 30C e 30D).

Na análise de cotilédones, foram observados em todos os casos, independentemente do tratamento, cultivar e nematoide, um pico maior no canal de intensidade de 50, referente à porcentagem de núcleos 2C, um pico intermediário no canal de intensidade entre 70 e 80, referente à porcentagem de núcleos 4C e um pico menor no canal de 100, correspondendo aos núcleos 8C, estes referentes ao processo de endorreduplicação que ocorre nas células do tecido dos cotilédones (Figura 30). De forma semelhante ao verificado no eixo embrionário, foram observados para as sementes secas, picos mais elevados, referentes aos núcleos 4C e 8C, nas sementes provenientes de plantas inoculadas com os nematoides (Figuras 30E e 30F). Para as hidratadas, foi observado maior quantidade de núcleos 4C e 8C nas sementes que não foram produzidas em plantas com a presença do nematoide (Figuras 30G e 30H).

Na tabela 21 estão apresentados os valores em porcentagem de núcleos celulares 2C, 4C e 8C e a razão 4C+8C/2C de eixo e de cotilédones de sementes secas provenientes de plantas com e sem nematoides *M. javanica*, submetidas ou não ao estresse hídrico.

Para a cultivar TMG-115RR foi observado maior quantidade de núcleos 2C tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones das sementes secas de plantas não inoculadas em relação às inoculadas para o tratamento sem estresse hídrico. Consequentemente, neste mesmo tratamento de estresse hídrico, foi verificado maior porcentagem de 4C no eixo e nos cotilédones e de núcleo 8C nos cotilédones para as sementes de plantas inoculadas (Tabela 21). Desta forma, a razão foi

maior para o eixo das sementes de plantas inoculadas nos dois tratamentos de estresse hídrico e para os cotilédones das sementes de plantas inoculadas no tratamento sem estresse hídrico.

Para a cultivar M 7908 RR, na análise de sementes secas, não foram verificadas diferenças na porcentagem de núcleos celulares em cada etapa do processo de divisão celular (Tabela 21).

Em relação ao estresse hídrico não foram verificadas diferenças na avaliação das sementes secas, independentemente do tecido analisado, da cultivar ou do tratamento de inoculação ao qual as plantas foram submetidas (Tabela 21).

A determinação do conteúdo celular por meio da citometria de fluxo é mais adequada quando feita com o eixo embrionário, pois neste tecido estão presentes os meristemas (ponta da radícula e plúmula) e é onde acontecem as maiores atividades de divisão celular, tanto no processo de formação das sementes quanto no processo de germinação. Para as sementes da cultivar TMG-115RR, observou-se que a maior razão ocorreu nas sementes de plantas com a presença do patógeno. Isso permite concluir que, nestas plantas, o processo de formação da semente foi precocemente atingido e ainda existiam núcleos celulares que estavam no processo de divisão, os quais foram identificados pela técnica de citometria de fluxo.

Para as sementes hidratadas (Tabela 22), para a cultivar TMG-115RR, foi verificado no eixo embrionário menor porcentagem de núcleos 2C paras as sementes de plantas não inoculadas não submetidas ao estresse hídrico e maior porcentagem de núcleos 4C e maior razão para as plantas não inoculadas independentemente do estresse hídrico. Para o cotilédone foi verificada maior porcentagem de núcleos 8C para as sementes de plantas não inoculadas. Em relação ao tratamento de estresse hídrico, foi verificado redução na quantidade de núcleos 2C para as sementes de plantas sem estresse hídrico para os dois tratamentos de população de nematoides (Tabela 22).

Nas sementes hidratadas da cultivar M 7908 RR foi verificado menor porcentagem de núcleos 2C, maior de núcleos 4C e maior razão para o eixo embrionário das sementes de plantas sem a submissão ao estresse hídrico em relação às estressadas (Tabela 22). Para os cotilédones não foi verificada nenhuma evidência do efeito do nematoide ou do estresse hídrico no processo de divisão celular.

A análise do conteúdo celular nas sementes durante a germinação permitiu fazer uma relação com o vigor destas. A quantidade de indução de síntese de DNA em sementes de baixo vigor é menor que em sementes mais vigorosas. Isto indica que o declínio na viabilidade de

sementes é precedido de redução na velocidade do metabolismo relacionado à germinação, o que inclui a replicação de DNA (LANTERI et al., 1997).

Na realidade, o mais importante para se fazer inferência em relação ao vigor das sementes é o acréscimo na atividade de divisão celular nos diferentes tratamentos de população de nematoides e estresse hídrico (Figura 31) e não apenas o valor do conteúdo celular na germinação. No geral, para o eixo embrionário das sementes da cultivar TMG115-RR foi observado maior razão nas sementes secas e menor durante a germinação para àquelas provenientes de plantas com nematoides em relação as não inoculadas, assim, o acréscimo nestas é bem menor que nas sementes não inoculadas (Figura 31). Nos tratamentos sem nematoides o acréscimo na razão 4C/2C foi de 0,071 e 0,060 nos tratamentos sem e com estresse hídrico, respectivamente, enquanto para os tratamentos com nematoides foi de 0,018 e 0,030 nos tratamentos sem e com estresse hídrico, respectivamente (Figura 31). O menor acréscimo nas sementes de plantas com o nematoide é um indício do efeito negativo da presença de nematoides na qualidade de sementes de soja, pois nestes casos as sementes requereram mais tempo para iniciar o processo de divisão celular e dar continuidade à germinação.

Para a cultivar M 7908 RR também foi verificada a mesma tendência de redução no incremento da razão 4C/2C em sementes de plantas com nematoides (Figura 31). Porém, neste caso, observou-se efeito do tratamento de estresse hídrico na redução dessa razão. Quando comparadas sementes de mesmo tratamento de estresse hídrico, as plantas sem a presença de nematoide tiveram um maior incremento na razão 4C/2C em relação às plantas não inoculadas.

Na Figura 29 está apresentado um esquema padrão da razão 4C/2C em sementes durante a germinação e a maturação. Este esquema foi desenvolvido a partir de dados e observações em vários trabalhos (BINO et al., 1993, LANTERI et al., 1993, 1994, 1995, 2000; SLIWINSKA, 1996; SLIWINSKA, 2000, 2003, 2009). Assim, verifica-se que quanto maior for esta razão durante a maturação de sementes, mais próximo do início está este processo; portanto, sementes secas com uma maior relação 4C/2C tiveram algum problema durante o processo de maturação que fez com que o final deste fosse precocemente alcançado. Por outro lado, para as sementes embebidas, durante o processo de germinação, quanto maior a razão 4C/2C mais próximo do final deste processo estará a semente. Assim, sementes que mais rapidamente atingirem maiores razões são sementes mais vigorosas, as quais provavelmente originarão plântulas normais mais rapidamente.

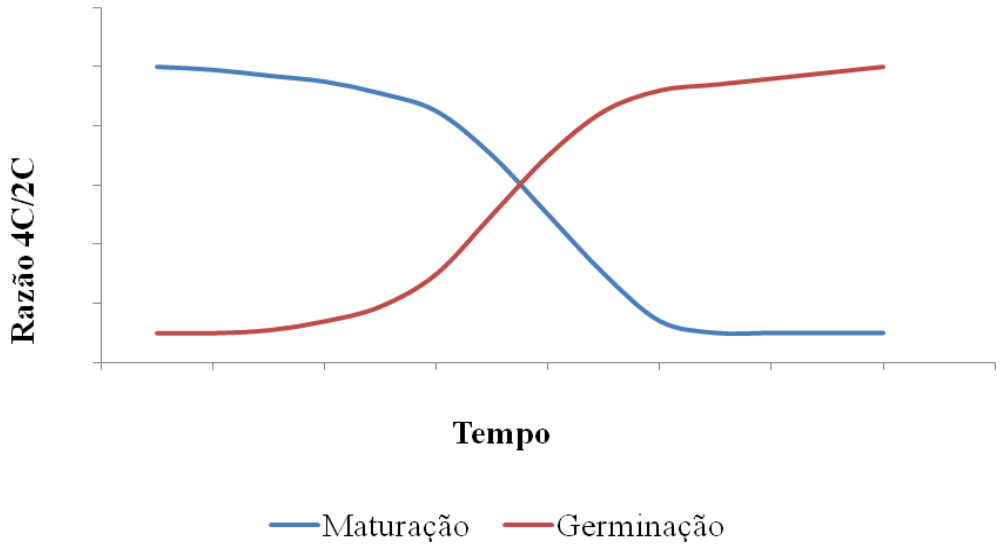


Figura 29 - Esquema padrão da razão 4C/2C em sementes durante a maturação e a germinação

2.3.3.4.2 Pratylenchus brachyurus

Os dados de citometria de fluxo para o experimento de *P. brachyurus* estão apresentados nas Tabelas 23 e 24.

Para a cultivar TMG-115RR, em sementes secas, tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones, não foi observada diferença na razão entre 4C+8C/2C. Na cultivar M 7908 RR, na avaliação do eixo embrionário, foi observado maior porcentagem de núcleos 2C, menor porcentagem de núcleos 4C e menor razão para as sementes provenientes de plantas sem nematoides, independentemente do tratamento de estresse hídrico (Tabela 23).

Nas sementes hidratadas foi verificado na cultivar TMG-115RR, maior porcentagem de núcleos 2C, menores de 4C e 8C e menor razão no eixo embrionário e nos cotilédones das sementes de plantas inoculadas com *P. brachyurus*, demonstrando a redução na atividade de divisão celular dessas sementes. Na cultivar M 7908 RR foi verificado menor razão 4C+8C/2C apenas no eixo embrionário de sementes de plantas inoculadas. Nos cotilédones foi verificado apenas menor quantidade de núcleos 2C nas sementes de plantas não inoculadas (Tabela 24).

Para *P. brachyurus*, quando se avaliou o incremento na atividade de divisão celular no eixo embrionário (Figura 32) entre as sementes secas e as sementes hidratadas, foi observado maior incremento na razão 4C/2C nos tratamentos sem nematoides em ambas as cultivares e ambas as condições de estresse hídrico.

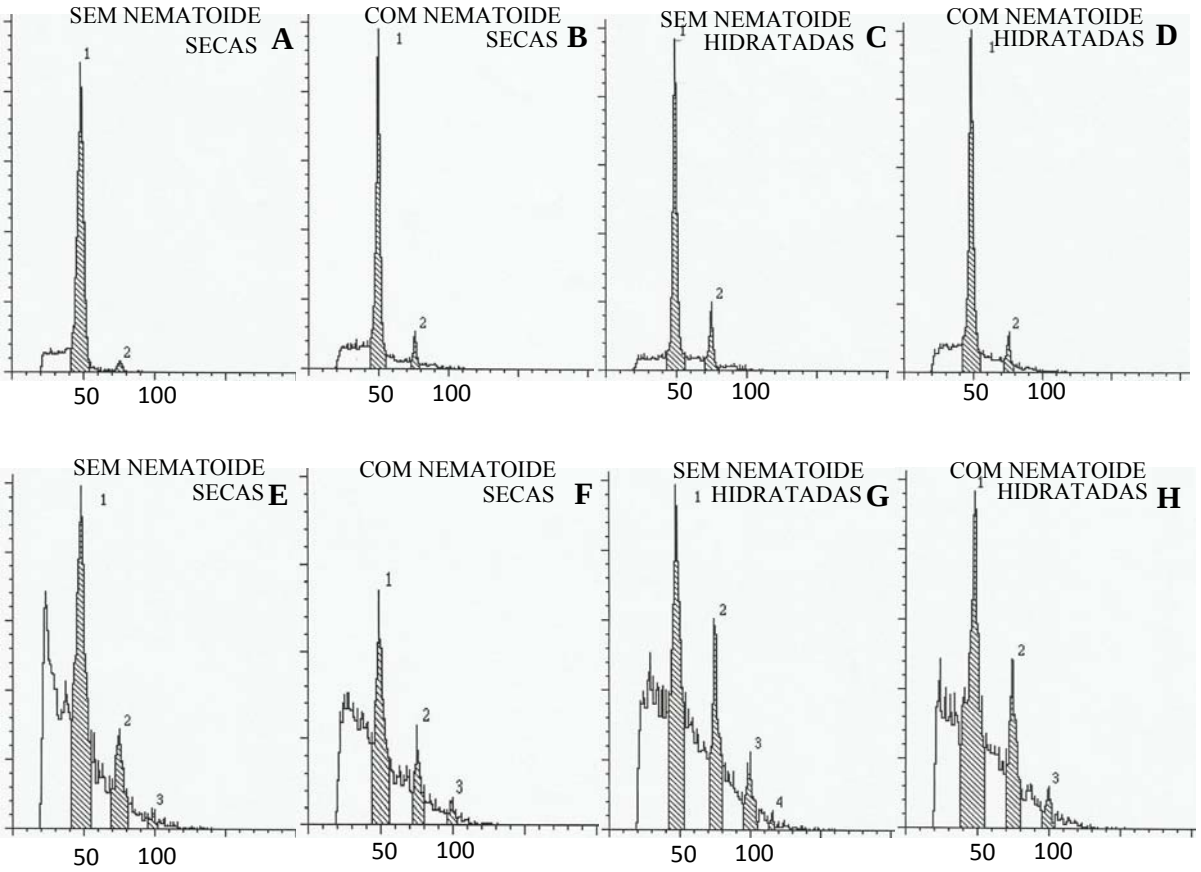


Figura 30 - Exemplos de histogramas de análise de núcleos celulares de sementes de soja secas e hidratadas por meio da citometria de fluxo. Eixo X - intensidade da fluorescência – varia de 0 a 200 com graduação a cada 10, Eixo Y - número de núcleos avaliados - varia de 0 a 1000 para as sementes secas com graduação a cada 40 e de 0 a 250 para as sementes hidratadas com graduação a cada 10. A = Eixo embrionário de sementes produzidas de plantas da cultivar TMG115-RR sem *M. javanica* e sem estresse hídrico. B = Eixo embrionário de sementes produzidas de plantas da cultivar TMG115-RR com *M. javanica* e com estresse hídrico. C = Eixo embrionário de sementes produzidas de plantas da cultivar TMG115-RR sem *M. javanica* e sem estresse hídrico. D = Eixo embrionário de sementes produzidas de plantas da cultivar TMG115-RR com *M. javanica* e sem estresse hídrico. E = cotilédones de sementes produzidas de plantas da cultivar TMG115-RR sem *P. brachyurus* e com estresse hídrico. F = cotilédones de sementes produzidas de plantas da cultivar TMG115-RR com *P. brachyurus* e com estresse hídrico. G = cotilédones de sementes produzidas de plantas da cultivar TMG115-RR sem *P. brachyurus* e com estresse hídrico. H = cotilédones de sementes produzidas de plantas da cultivar TMG115-RR com *P. brachyurus* e com estresse hídrico

Tabela 21 – Porcentagem de núcleos celulares em estádio de divisão 2C, 4C, 8C e relação 4C+8C/2C em sementes de soja secas produzidas em plantas com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*M. javanica)*

Cultivar	Parte	Pop.	2C		4C		8C		4C+8C/2C	
			C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	Eixo	0	96,4 Aa	96,8 Aa	3,6 Aa	3,2 Ab	-	-	0,038 Ab	0,033 Ab
		7000	95,3 Aa	94,8 Ab	4,7 Aa	5,2 Aa	-	-	0,049 Aa	0,055 Aa
	CV		1,56		35,87		-		38,41	
	Cot.	0	73,8 Aa	74,7 Aa	20,5 Ab	20,4 Ab	5,7 Aa	4,9 Aa	0,355 Aa	0,339 Ab
		7000	71,0 Aa	70,6 Ab	26,3 Aa	27,2 Aa	2,7 Ab	2,2 Ab	0,408 Aa	0,417 Aa
	CV		4,65		12,00		42,72		18,26	
M 7908 RR	Eixo	0	94,2 Aa	94,9 Aa	5,8 Aa	5,1 Aa	-	-	0,062 Aa	0,054 Aa
		7000	94,7 Aa	95,1 Aa	5,3 Aa	4,9 Aa	-	-	0,056 Aa	0,052 Aa
	CV		1,30		23,42		-		25,05	
	Cot.	0	76,3 Aa	76,1 Aa	20,0 Aa	19,4 Aa	3,7 Aa	4,4 Aa	0,310 Aa	0,314 Aa
		7000	75,8 Aa	75,6 Aa	20,0 Aa	20,4 Aa	4,2 Aa	4,0 Aa	0,319 Aa	0,323 Aa
	CV		3,57		11,40		30,47		14,91	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 22 – Porcentagem de núcleos celulares em estádio de divisão 2C, 4C, 8C e relação 4C+8C/2C em sementes de soja hidratadas por 16 horas à 25º C, produzidas em plantas com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*M. javanica)*

Cultivar	Parte	Pop.	2C		4C		8C		4C+8C/2C	
			C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	Eixo	0	91,1 Aa	90,6 Ab	8,9 Aa	9,4 Aa	-	-	0,098 Aa	0,104 Aa
		7000	92,6 Aa	93,2 Aa	7,4 Ab	6,8 Ab	-	-	0,079 Ab	0,073 Ab
	CV		1,56		15,39				18,86	
	Cot.	0	68,5 Aa	63,0 Ba	24,2 Aa	28,0 Aa	7,3 Aa	9,0 Aa	0,460 Ba	0,588 Aa
		7000	68,5 Aa	64,6 Ba	28,0 Aa	30,4 Aa	3,8 Ab	4,9 Ab	0,463 Aa	0,548 Aa
	CV		5,42		14,09		49,22		16,07	
M 7908 RR	Eixo	0	90,8 Ab	88,2 Bb	9,2 Ba	11,8 Aa	-	-	0,101 Ba	0,134 Aa
		7000	92,5 Aa	91,0 Aa	7,5 Ab	9,0 Ab	-	-	0,081 Ab	0,099 Ab
	CV		1,55		15,00				16,81	
	Cot.	0	69,9 Aa	68,1 Aa	24,6 Aa	24,6 Aa	5,5 Ba	7,3 Aa	0,430 Aa	0,469 Aa
		7000	68,1 Aa	69,8 Aa	26,5 Aa	25,9 Aa	5,4 Aa	4,3 Ab	0,468 Aa	0,432 Aa
	CV		4,94		12,41		25,44		15,95	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 23 – Porcentagem de núcleos celulares em estádio de divisão 2C, 4C, 8C e relação 4C+8C/2C em sementes de soja secas produzidas em plantas com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*P. brachyurus)*

Cultivar	Parte	Pop.	2C		4C		8C		4C+8C/2C	
			C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	Eixo	0	95,1 Aa	95,5 Aa	4,9 Aa	4,5 Aa	-	-	0,051 Aa	0,047 Aa
		7000	95,1 Aa	95,0 Aa	4,9 Aa	5,0 Aa	-	-	0,051 Aa	0,053 Aa
	CV		1,14		22,68				23,98	
	Cot.	0	68,9 Aa	67,6 Ab	24,2 Aa	25,0 Aa	6,9 Aa	7,4 Aa	0,451 Aa	0,479 Aa
		7000	69,8 Aa	71,0 Aa	25,7 Aa	23,9 Aa	4,5 Ab	5,2 Ab	0,432 Aa	0,409 Aa
	CV		4,29		9,38		29,10		15,44	
M 7908 RR	Eixo	0	94,4 Aa	94,0 Aa	5,6 Ab	6,0 Ab	-	-	0,059 Ab	0,064 Ab
		7000	93,0 Ab	92,5 Ab	7,0 Aa	7,5 Aa	-	-	0,076 Aa	0,081 Aa
	CV		1,16		16,67				17,87	
	Cot.	0	72,1 Aa	73,5 Aa	22,8 Aa	22,0 Aa	5,0 Aa	4,5 Aa	0,386 Aa	0,359 Aa
		7000	73,0 Aa	73,7 Aa	21,4 Aa	21,4 Aa	5,5 Aa	4,9 Aa	0,369 Aa	0,357 Aa
	CV		4,87		13,60		40,12		18,93	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 24 – Porcentagem de núcleos celulares em estádio de divisão 2C, 4C, 8C e relação 4C+8C/2C em sementes de soja hidratadas por 16 horas à 25º C, produzidas em plantas com (C) ou sem (S) estresse hídrico, submetidas ou não à inoculação com 7000 nematoides (*P. brachyurus)*

Cultivar	Parte	Pop.	2C		4C		8C		4C+8C/2C	
			C	S	C	S	C	S	C	S
TMG-115RR	Eixo	0	90,8 Ab	91,1 Ab	9,2 Aa	8,9 Aa	-	-	0,101 Aa	0,098 Aa
		7000	92,8 Aa	93,2 Aa	7,2 Ab	6,8 Ab	-	-	0,078 Ab	0,073 Ab
	CV		1,77		20,30				22,50	
	Cot.	0	61,1 Ab	60,6 Ab	27,8 Aa	27,1 Aa	11,1 Aa	12,4 Aa	0,636 Aa	0,651 Aa
		7000	66,9 Aa	66,4 Aa	26,1 Aa	25,6 Aa	7,0 Ab	7,9 Ab	0,495 Ab	0,505 Ab
	CV		6,76		10,85		27,20		20,47	
M 7908 RR	Eixo	0	89,0 Aa	89,2 Aa	11,0 Aa	10,8 Aa	-	-	0,124 Aa	0,121 Aa
		7000	90,7 Aa	90,4 Aa	9,3 Ab	9,5 Aa	-	-	0,103 Ab	0,106 Ab
	CV		1,95		13,81				14,64	
	Cot.	0	61,6 Ab	62,0 Ab	28,5 Aa	28,3 Aa	9,9 Aa	9,7 Aa	0,622 Aa	0,613 Aa
		7000	64,4 Aa	65,1 Aa	26,7 Aa	26,4 Aa	8,9 Aa	8,5 Aa	0,554 Aa	0,537 Aa
	CV		6,00		8,71		29,44		17,42	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas para cada cultivar e avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

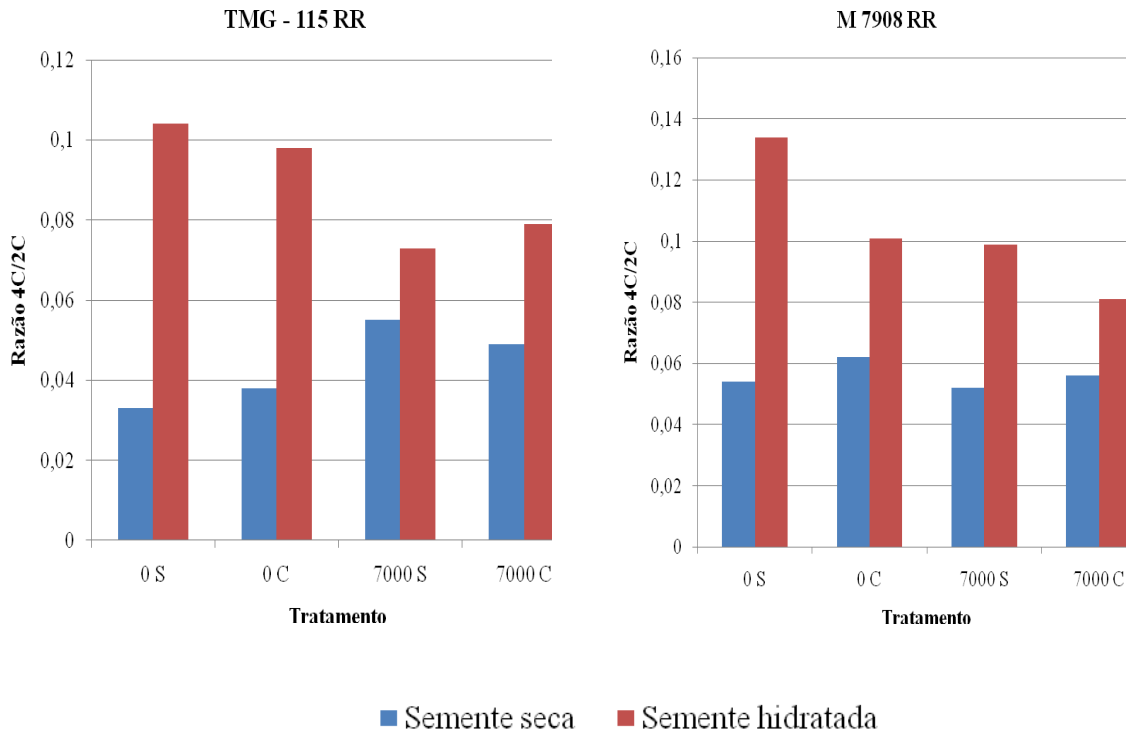


Figura 31 - Razão 2C/4C avaliada por meio da citometria de fluxo em eixo embrionário de sementes de soja provenientes de plantas inoculadas ou não com *Meloidogyne javanicas*. 0 - planta sem nematoide, 7000 - planta com inoculação de 7000 nematoides, S – plantas sem estresse hídrico e C – plantas com estresse hídrico

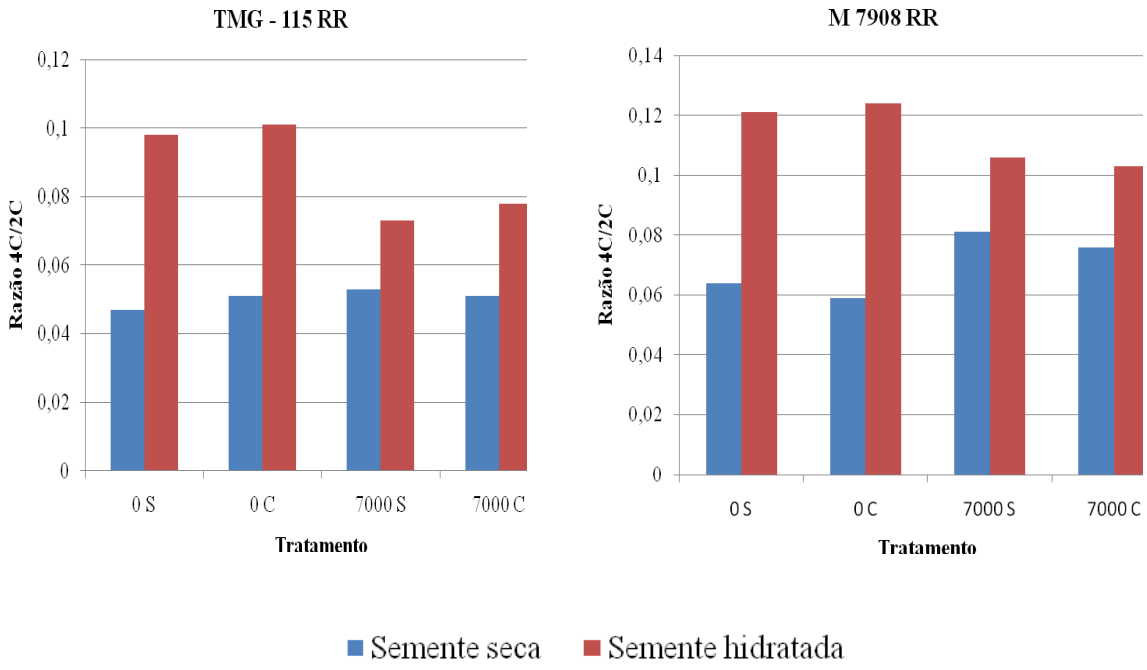


Figura 32 - Razão 2C/4C avaliada por meio da citometria de fluxo em eixo embrionário de sementes de soja provenientes de plantas inoculadas ou não com *Pratylenchus brachyurus*. 0 - planta sem nematoide, 7000 - planta com inoculação de 7000 nematoides, S – plantas sem estresse hídrico e C – plantas com estresse hídrico

2.3.4 Considerações finais

Com os resultados do experimento I, foi possível determinar que, independentemente da população inicial e da espécie de nematoide, houve morte prematura das plantas inoculadas em relação àquelas sem a presença do patógeno. Foi verificado, em alguns casos, leve queda dos parâmetros de produtividade à medida que se aumentava a população final. Por outro lado, apesar de ter sido verificada alta multiplicação dos nematoides, não foram observadas importantes diferenças no potencial fisiológico das sementes e, principalmente, na ocorrência de sementes esverdeadas.

A morte prematura verificada nas plantas inoculadas poderia ter sido fator determinante no favorecimento da ocorrência de sementes esverdeadas; porém, a utilização da cultivar Pintado pode ter sido limitante na ocorrência de sementes esverdeadas por ser considerada, por algumas empresas, uma cultivar pouco sensível a este problema.

Apesar de ser pouco sensível a ocorrência de sementes esverdedas, optou-se pela cultivar Pintado no experimento I, devido esta ser muito suscetível tanto a *P. brachyurus* quanto a *M. javanica*. Dessa forma, para o experimento III, foram selecionados cultivares suscetíveis (a partir dos resultados do experimento II), dentre os quais as empresas produtoras de sementes consideram como sendo sensíveis a ocorrência de sementes esverdeadas.

Além disso, a baixo efeito dos nematoides nas condições em que as plantas foram submetidas foi determinante para a escolha de uma população inicial mais elevada, utilizada no experimento III, igual a 7000 nematoides por planta, juntamente com a ocorrência de estresse hídrico com o intuito de facilitar o parasitismo; isso foi realizado porque observações de campo mostraram que grandes perdas de produção e interferência do desenvolvimento das plantas podem ocorrer em lavouras sob situações que favoreçam o parasitismo.

Os resultados obtidos no experimento II demonstraram que todas as cultivares testadas poderiam ser utilizados no experimento III, porém, de acordo com algumas empresas produtoras de sementes, as cultivares M 7908 RR, TMG 115 RR e TMG 131 RR são consideradas mais sensíveis à ocorrência de sementes esverdeadas. Dessa forma, foram escolhidos entre estas três cultivares, duas que tiveram maiores fatores de reprodução para os dois nematoides, sendo estas o M 7908 RR e o TMG 115 RR.

Os resultados obtidos no experimento III permitem afirmar que a inoculação de 7000 espécimes de *M. javanica* na cultivar TMG-115RR afetou a produção em plantas de soja, levando-se em consideração os números de vagens e de sementes, a massa total de sementes e a massa de matéria seca de parte aérea. Nestas mesmas condições foi verificado menor potencial fisiológico para estas sementes, parâmetro confirmado pelas análises de citometria

de fluxo. A redução do potencial fisiológico pode ter sido conseqüência da maior ocorrência de sementes esverdeadas nos tratamentos de plantas inoculadas. A cultivar M 7908 RR, quando inoculada com *M. javanica* também teve queda na produção, no potencial fisiológico das sementes e aumento na ocorrência de sementes esverdeadas, porém, muito sutil quando comparado à outra cultivar. Com isso, é possível concluir que a cultivar TMG-115RR é mais sensível a presença do nematoide nestas condições de estudo.

Para os experimentos com *P. brachyurus*, foi verificada pequena queda na produção e na qualidade das sementes de plantas inoculadas com o nematoide para a cultivar TMG-115RR. Por outro lado, as análises de fluorescência de clorofila e de citometria de fluxo, permitiram verificar maior ocorrência de sementes esverdeadas e menor potencial fisiológico para as sementes de plantas inoculadas com o nematoide. Para a cultivar M 7908 RR, foi observado desempenho semelhante ao das sementes da cultivar TMG-115RR, com exceção de que não houve diminuição na produção destas.

Os testes de fluorescência de clorofila e de citometria de fluxo foram muito importantes para a complementação dos resultados da análise visual de ocorrência de sementes esverdeadas e dos testes de determinação do potencial fisiológico, respectivamente.

Dessa forma, tem-se que a intensidade da interferência de nematoides na produção e na qualidade de sementes de soja depende entre muitos fatores, da espécie de nematoide, da população inicial, da cultivar e das condições ambientais a que as plantas foram submetidas.

3 CONCLUSÕES

- A presença de *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* em plantas de soja provoca a redução do ciclo da planta devido exclusivamente à diminuição do estádio de senescência. Portanto, a presença de nematoides provoca a morte prematura em plantas de soja.

- A intensidade do efeito dos nematoides *M. javanica* e de *P. brachyurus* no desenvolvimento de plantas de soja, na ocorrência de sementes esverdeadas e no seu potencial fisiológico depende da população inicial e da espécie de nematoide, da cultivar e das condições ambientais em que as plantas são submetidas.

REFERÊNCIAS

ABAWI, G.S.; BARKER, K.R. Effects of cultivar, soil temperature and population levels of *Meloidogyne incognita* on root necrosis and *Fusarium* wilt of tomatos. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 4, p. 433-438, 1984.

ABRÃO M.M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 19-26, 2001.

ADAMS, C.A.; FJERSTAD, M.C.; RINNE, R.W. Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 2, p. 265-267, 1983.

ASMUS, G.L. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em algodoeiro no Estado de Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 77-86, 2004.

ASMUS, G.L.; ANDRADE, P.J.M. Reação de cultivares de soja recomendadas para o Estado de Mato Grosso do Sul a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 74-79, 1996.

ASMUS, G.L.; FERRAZ, L.C.C.B. Relações entre a densidade populacional de *Meloidogyne javanica* e a área foliar, a fotossíntese e os danos causados a variedades de soja. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2001.

BARKER, K.R.; OLTHOF, T.H.A. Relationships between nematode population densities and crop responses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 14., n. 1, p. 327-353, 1976.

BASTOS FILHO, G.; NAKAZONE, D.; BRUGGEMANN, G.; MELO, H. Rally da safra 2007: uma avaliação do plantio direto no Brasil. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, n. 101, p. 14-19, 2007.

BERKE, T.; BLACK, L.L.; TALEKAR, N.S.; WANG, J.F., GNIFFKE, P. GREEN, S.K. WANG, T.C.; MORRIS, R. **Suggested cultural practices for chili pepper**. Shanhua: Intenational Cooperators Guide, World Vegetable Center, 2005. 8 p.

BINO, R.J., LANTERI, S., VERHOEVEN, H.A. AND KRAAK, H.L. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. **Annals of Botany,** London, v. 72, n. 2, p. 181–187, 1993.

BIRD, A.F. Influence of temperature on embryogenesis in *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Raleigh, v. 4, p. 206- 213, 1972.

BOHNER H. **Green soybeans.** Ontario: Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2003. Disponível em: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/ green_ beans 02.htm>. Acesso em: 02 out. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasilia: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 399 p.

BURRIS, J.S. Effect of seed maturation and plant population on soybeans seed quality. **Agronomy Journal,** Madison, v. 65, n. 3, p. 440-441, 1973.

CARNEIRO, R.G. **Efeitos de *Meloidogyne incognita* raça 3 e *M. javanica* sobre a absorção e translocação de nitrogênio, fósforo e cálcio e sobre a partição de carbono em cultivares de soja**. 2000. 96 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

CARNEIRO, R.G.; MAZZAFERA, P.; FERRAZ, L.C.C.B. Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v. 31, n. 3, p. 348-355, 1999.

CARVALHO, D.B. de. Análise de crescimento de girassol em sistema de semeadura direta. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 2, n. 4, p. 63-70, 2004.

CHRISTIE, J.R. **Plant nematodes their bionomics and control**. Gainesville: Agricultural Experiment Stations, 1959. 216 p.

CICERO, S.M.; VAN SCHOOR, R.; JALINK, H. Use of chlrophyll fluorescence sorting to improve soybean seed quality. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 31, n. 4, p. 145-151, 2009.

CIRRINICIONE, P.; TEFFT, P.M.; SPRINGER, C.J. The effect of early soybean cyst nematode infection on soybean growth and physiology. **Journal of Nematology**, Raleigh, v. 41, n. 4, p. 319, 2009.

CLAESSEN, M.E.C. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, CNPS, 1997. 212 p. (EMBRAPA. CNPS, Documentos 1).

COOLEN, D.A.; D'HERDE, C.J. **A method for quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Nematology and entomology Research Station, 1972. 77 p.

COSTA, D.C.; FERRAZ, S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de soja a *Pratylenchus brachyurus*. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, Goiânia, v. 28, n. 2, p. 67-76, 1998.

COSTA, N.P.; FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, J.E.; MESQUITA, C.M.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 102-107, 2001.

COSTA, N.P.; MESQUITA, C.M.; MAURINA, A.C.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. Qualidade fisiológica, física e sanitária de sementes de soja produzidas no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 128-132, 2003.

CUSTÓDIO, C.C.; MARCOS FILHO,J. Potassium leachate test for the evaluation of soybean seed physiological quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 3, p. 549-564, 1997.

De VOS, C.H.R.; KRAAK, H.L.; BINO, R.J. Ageing of tomato seeds involves glutathione oxidation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 92, n. 1, p. 131-139, 1994.

Di VITO, M.D.; GRECO, N.; CARELLA, A. The effect of population densities of *Meloidogyne incognita* on the yield of cantaloupe and tobacco. **Nematologia Meditêrranea**, Bari, v. 11, p. 169-174, 1983.

DIAS, W.P.; GARCIA, A.; SILVA, J.F.V. Nematoides associados à cultura da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 22., 2000, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: Editora UFV, 2000. p. 59-65.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GIL, M.A.; GARCIA, V.; MENEGOTI, C.C. Efeito da torta de filtro e de nematoides sobre a infestação de nematoide e a produtividade de cana-de-açucar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 27, n. 1, p. 61-67, 2003.

DORNBOS, D.L.; McDONALD, M.B. Mass and composition of developing soybean seeds at five reproductive growth stages. **Crop Science**, Madison, v. 26, n. 3, p. 624-630, 1986.

DORNBOS, D.L.; MULLEN, R.E. Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination and seedling growth rate. **Canadian Journal of Plant Science,** Ottawa, v. 71, n. 2, p. 373-383, 1991.

EGLI, D.B. **Seed biology and the yield of grain crops**. New York: CABI International, 1998. 178 p.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p. (Special Report, 80).

FERRAZ, L.C.C. B. Interações entre *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne javanica* em soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 305-309, 1995a.

_____. Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* a três cultivares de soja. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 19, p. 1-8, 1995b.

_____. Reações de cultivares de soja a *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 20, n. 1, p. 22-31, 1996.

_____. Gênero *Pratylenchus* – os nematóides das lesões radiculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 157-195, 1999.

_____. As Meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J.F.V. **Relação parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja; Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. cap. 1, p. 15-38.

_____. O nematóide *Pratylenchus brachyurus* e a soja sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, n. 96, p. 23-27, 2006.

FERRAZ, L.C.C.B.; LORDELLO, L.G.E. Suscetibilidade e danos a espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* por nematóides das galhas no Estado de São Paulo. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 57, p. 67-75, 1982.

FERRAZ, L.C.; MONTEIRO, A.R. Nematóides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia:** princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1, p. 277-305.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G. de; LOPES, E.A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. **Manejo sustentável de fitonematóides**. Viçosa: Editora UFV, 2010. 306 p.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja.** Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1998. 72 p. (EMBRAPA. CNPSo. Documentos, 116).

FRANÇA NETO, J.B.; PÁDUA, G.P.; KRZYZANOWSKI, F.C., CARVALHO, M.L.M. de; HENNING, A.A.; LORINI, I. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico – série sementes.** Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 2012. 16 p. (Circular Técnica, 91).

FRANÇA NETO, J.B.; PÁDUA, G.P.;CARVALHO, M.L.M. de; COSTA, O.; BRUMATTI, P.S.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P.; HENNING, A.A.; SANCHES, D.P. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 2005. 8 p. (Circular Técnica, 38).

GARCIA, J.; COSTA, N.M.; RODRIGUES, A.N.A. **Ocorrência e controle de nematoses do cafeeiro em Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA, CPAF, 2000. 22 p. (Circular Técnica, 52).

GIELFI, F.S.; SANTOS, J.M.; ATHAYDE, M.L.F. Reconhecimento das espécies de fitonematóides associadas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no estado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. **Resumos…** Goiânia: Fialgo; Embrapa algodão, 2003. 1 CD ROM.

GONÇALVES, W.; MAZZAFERA, P.; FERRAZ, L.C.C.B.; SILVAROLLA, M.B.; LIMA, M.M.A. Biochemical basis of coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita*. **Plantations, Recherché, Developpment**, Montpellier, v. 2, n. 1, p. 54-60, 1995.

GOODELL, P.B.; FERRIS, H. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. **Journal of** N**ematology**, Raleigh, v. 21, n. 3, p. 328-334, 1989.

GOULART, A.M.C. **Aspectos gerais sobre nematoides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2008. 30 p. (Documentos, 219).

GUIAMÉT, J.J.; SCHWARTZ, E.; PICHERSKY, E.; NOODÉN, L.D. Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and chlorophyll-binding proteins during senescence in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 1, p. 227-231, 1991.

HILLOCKS, R.J.; STOKES, S.; JONES, M. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on legume crops and some weed species associated with their cultivation in Malawi. **Nematologica**, Leiden, v. 41, n. 5, p. 505-515, 1995.

HOFFMASTER, A.F.; XU, L.; FUJIMURA, K.; MCDONALD, M.B.; BENNETT, M.A.; EVANS, A.F. The Ohio State University seed vigor imaging system (SVIS) for soybean and corn seedlings. **Journal Seed Technology**, Spring Field, v. 27, n. 1, p. 7-24, 2005.

HOOPER, D.J. Extraction of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J.F. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. London: Her Majesty´s Stationery Office, 1986. p. 5-30.

HUSSEY, R.S.; WILLIAMSON, V.M. Physiologycal and molecular aspects of nematode parasitism. In: BAKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. **Plant and nematodes interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. chap. 5, p. 87-108.

IBRAHIM, A.A.M.; AL-HAZMI, A.S.; AL-YAHYA, F.A.; ALDERFASI, A.A. Damage potential and reproduction of *Heterodera avenae* on wheat and barley under Saudi field conditions. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 6, p. 625-630, 1999.

INOMOTO, M.M. ; ASMUS, G.L. Host status of graminaceous cover crops for *Pratylenchus brachyurus*. **Plant Disease**, Ames, v. 94, n. 8, p. 1022-1025, 2010.

INOMOTO, M.M.; MOTTA, L.C.C.; BELUTI, D.B.; MACHADO, A.C.Z. Reação de seis adubos verdes a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 30, n. 1, p. 39-44, 2006.

JALINK, H.; FRANDAS, A.; van der SCHOOR, R.; BINO, J.B. Chlorophyll fluorescence of the testa of *Brassica oleracea* seeds as an indicator of seed maturity and seed quality. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v. 55, special issue, p. 88-93, 1998a.

JALINK, H.; van der SCHOOR, R.; BIRNBAUM, Y.E.; BINO, R.J. Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 504, n. 12, p. 219-228, 1999.

JALINK, H.; van der SCHOOR, R.; FRANDAS, A.; van PIJLEN, J.G. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, New York, v. 8, n. 4, p. 437-443, 1998b.

JOHNSON-FLANAGAN, A.M.; SPENCER, M.S. Chlorophyllase and peroxidase activity during degreening of maturing canola (*Brassica napus*) and mustard (*Brassica juncea*) seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 2, p. 353-359, 1996.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.M.A.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663p.

KOENNING, S.R.; BARKER, K.R. Soybean photosynthesis and yield as influenced by *Heterodera glycines*, soil type and irrigation. **Jounal of Nematology**, Lake Alfred, v. 27, n. 1, p. 51-62, 1995.

KOENNING, S.R.; OVERSTREET, C.O.; NOLING, J.W. DONALD, P.A., BECKER, J.O.; FORTNUM, B.A. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v. 31, n. 4, p. 587-618, 1999.

LANTERI, S.; BELLETTI, P.; NADA, E.; QUAGLIOTTI, L. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in pepper seeds during priming and germination. **Capsicum and Eggplant Newsletter,** Turin, v. 14, p. 72–75, 1995.

LANTERI, S.; KRAAK, H.L.; DE VOS, C.H.R.; BINO, R.J. Effects of osmotic preconditioning on nuclear replication activity in seeds of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 89, n. 3, p. 433-440, 1993.

LANTERI, S.; PORTIS, E.; BERGERVOET, J.H.W.; GROOT, S.P.C. Molecular markers for the priming of pepper seeds (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology,** London, v. 75, n. 5, p. 607–611, 2000.

LANTERI, S.; SARACCO, F.; KRAAK, H.L.; BINO, R.J. The effects of priming on nuclear replication activity and germination of pepper (Capsicum annuum) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. **Seed Science Research,** Wallingford, v. 4, n. 1, p. 81–87, 1994.

LANTERI, S.; NADA, E.; BELLETTI, P.; QUAGLIOTTI, L.; BINO, R.J. Effects of controlled deterioration and osmoconditioning on germination and nuclear replication in seeds of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Annals of Botany,** New York, v. 77, n. 6, p. 591–597, 1996.

LANTERI, S.; BELLETTI, P.; MARZACH, C.; NADA, E.; QUAGLIOTTI, L.; BINO, R.J. Priming-induced nuclear replication activity in pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds: effect on germination and storability. In: ELLIS, R.H.; BLACK, M.; HONG, T.D. **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 451-459.

LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 6. ed. São Paulo: Nobel, 1988. 314 p.

MACHADO, A.C.Z.; INOMOTO, M.M. Host status of eighteen vegetable crops for *Pratylenchus brachyurus*. **Nematropica**, Bradenton, v. 31, p. 257-263, 2001.

MACHADO, A.C.Z.; BELUTI. D.B.; SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; INOMOTO, M.M. Avaliação de danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 11-16, 2006.

MACHADO, A.C.Z.; MOTTA, L.C.C.; SIQUEIRA, K.M.S.; FERRAZ, L.C.C.B.; INOMOTO, M.M. Host status of Green manures for two isolates of *Pratylenchus brachyurus* in Brazil. **Nematology**, Leiden, v. 9, n. 6, p. 799-805, 2007.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, Comitê de Vigor de Sementes, 1999. cap. 3, p.1-24.

_____. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARCOS FILHO, J.; KIKUTI, A.L.P.; LIMA, L.B. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo a análise computadorizada de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 102-112, 2009.

McINTYRE, G.I. The role of water in the regulation of plant development. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 7, p. 1287-1298, 1987.

MEDINA, P.F.; LAGO, A.A.; RAZERA, L.F. & MAEDA, J.A. Composição física e qualidade de lotes de sementes de soja com incidência de sementes esverdeadas. **Infomativo ABRATES**, Curitiba, v. 7, n. 1/2, p. 36, 1997.

MELAKEBERHAN, H.; FERRIS, H.; DIAS, J.M. Physiological response of resistant and susceptible *Vitis vinifera* to *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v. 22, p. 224-230, 1990.

MENDES, M.L.; RODRIGUEZ, P.B.N. Reação de cultivares de soja (*Glycine Max* L. Merrill) aos nematóides de galhas *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raças 1,2,3 e 4. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 24, n. 2, p. 211-217, 2000.

MENDES, M.L.; CAMILO, O.C.; VICENTE, F.R.; RODRIGUEZ, P.B.N. Reação de genótipos de soja (*Glycine Max* L. Merrill) a *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, n. 1, p. 89-93, 2001.

MOURA, R.M.; PEDROSA, E.M.; PRADO, M.D.C.; Incidência de Pratylenchus coffeae causando severa nematose em cafeeiro do nordeste. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 649, 2002.

MOURA, R.M.; GUIMARÃES, L.M.P.; MARANHÃO, S.R.V.L.; PEDROSA, E.M.R. Pratilencose atípica assinalada no Estado do rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 629, 2004.

OLOWE, T.; CORBETT, D.C.M. Aspects of the biology of *Pratylenchus brachyurus* and *P. zeae*. **Nematologica**, Leiden , v. 22, n. 2, p. 202-211, 1976.

OOSTENBRINK, M. **Major characteristics of the relations between nematodes and plants**. Wageningen: Mededelingen Landbouwhogeschool,1966. 46 p.

PÁDUA, G.P. **Retenção de clorofila e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de semente de soja**. 2006. 160 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PÁDUA, G.P.; CARVALHO, M.L.M.; FRANÇA-NETO, J.B.; GUERREIRO, M.C.; GUIMARÃES, R.M. Response of soybean genotypes to the expression of green seed under temperature and water stresses. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 140-149, 2009a.

PÁDUA, G.P.; FRANÇA NETO, J.B.; CARVALHO, M.L.M.; KRZYZANOWSKI, F.C.; GUIMARÃES, R.M. Incidence of green soybean seeds as a function of environmental stresses during seed maturation. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 150-159, 2009b.

PÁDUA, G.P.; FRANÇA-NETO, J.B.; CARVALHO, M.L.M.; COSTA, O.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 3, p. 128-138. 2007.

PÁDUA, G.P.; FRANÇA NETO, J.B.; CARVALHO, M.L.M.; COSTA, O.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.; HENNING, A.A. Determinação do nível máximo de tolerância de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v. 15, n. 1/2/3, p. 56, 2005.

PUPIM, T.L.; CARVALHO, M.L.M.; PÁDUA, G.P.; NERY, M.C.; FRANÇA-NETO, J.B. Ocorrência de sementes verdes e qualidade fisiológica de sementes de soja. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v. 15, n. 1/3, p. 238, 2005.

RANGEL, M.A.S.; MINUZZI, A.; PIEREZAN, L.; TEODÓSIO, T.K.C.; ONO, F.B.; CARDOSO, P.C. Presença e qualidade de sementes esverdeadas de soja na região sul do estado do Mato Grosso do Sul. **Acta Scientarum – Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 127-132, 2011.

RITZINGER. C.H.S.P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1289-1296, 2010.

ROCHA, F.S.; PINHEIRO, J.B.; CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P.; Relação entre populações iniciais de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* e o desenvolvimento do Sistema radicular de soja. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 2, p. 161-166, 2008.

SALE, P.W.G.; CAMPBELL, L.C. Changes in physical characteristics and composition os soybean seed during crop development. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 3, p. 147-155, 1980.

SANTOS Jr., R.F.; RUDORF, B.F.T.; SANTOS, J.M.; MARCHIORATO, I.A.. Comportamento espectral de soja (BRS133) infestada por *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, n. 1, p. 53-61, 2001.

SASSER, J.N.; CARTER, C.C.; HARTMAN, K.M. **Standartization of host suitability studies and reporting of plant resistance to root-knot nematodes**. Raleigh: North Carolina State University; USAID, 1984. 7 p.

SCHIMITT, D.P.; BARKER, K.R. Damage and reproductive potentials of *Pratylenchus brachyurus* and *P. penetrans* on soybean. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 13, n. 3, p. 327-332, 1981.

SEINHORST, J.W.; den OUDEN, H. The relation between density of *Heterodera rostochiensis* and growth and yield of two potato varieties. **Nematologica**, Leiden, v. 17, n. 3, p. 347-369, 1971.

SEVERINO, J.J.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; TESSMAN, D.V. Nematodes associated with sugarcane in sandy soils in Paraná, Brazil. **Nematropica**, Auburn, v. 40, n. 1, p. 111-119, 2010.

SHARMA, R.D.; FONSECA, C.E.L. Efeito de *Meloidogyne javanica* no crescimento da ervilha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 115-120, 2000.

SHARMA, R.D.; RODRÍGUEZ, C. Efeito da densidade de população inicial do nematoide *Meloidogyne javanica* sobre o desenvolvimento e rendimento da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 469-477, 1982.

SHARMA, R.D.; ARAÚJO, V.I.; CAVALCANTE, M.J.B.; GOMES, A.C. Reação de genótipos de pimenta-longa aos nematoides *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* raça 1 e *Rotylenchulus reniformes*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 2, p. 83-86, 2005.

SILVA, R.A.; PEREIRA, L.C. Efeitos de densidades populacionais de *Pratylenchus brachyurus* na produtividade de duas cultivares de soja, em condições de campo. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 27, n. 2, p. 268, 2003.

SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; GOMES, A.C.; BORGES, D.C.; SOUZA, A.A.; ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M. Ocorrência de *Pratylencus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, n. 3, p. 337, 2004.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de semente de soja**. 2002. 103 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SLIWINSKA, E. Flow cytometric analysis of the cell cycle of sugar-beet seed during germination. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 37, p. 254–257, 1996.

SLIWINSKA, E. Flow cytometric analysis of sugar-beet seeds different in vigour. In: ELLIS, R.H.; BLACK, M.; HONG, T.D. **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 577-584.

_____. Analysis of the cell cycle in sugarbeet seed during development, maturation and germination. In: BLACK, M.; BRADFORD, K.J.; VAZQUEZ-RAMOS, J. **Seed biology:** advances and applications. Wallingford: CAB International, 2000. p.133-139.

_____. Cell cycle and germination of fresh, dried and deteriorated sugar-beet seeds as indicators of optimal harvest time. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 2, p. 131–138, 2003.

_____. Nuclear DNA replication and seed quality. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 19, n. 1, p. 15-25, 2009.

SOARES, P.L.M.; SANTOS, J.M. Reação de cultivares de soja a uma população de *Meloidogyne javanica*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 2, p. 33-36, 2009.

STECKEL, J.R.A.; GRAY, D.; ROWSE, H.R. Relatioships between indices of seed maturity and carrot seed quality. **Annals of Applied biology**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 177-183, 1989.

SUMMERFIELD, R.J. Vegetative growth, reproductive ontogeny and seed yield of selected tropical grain legumes. In: MCFARLANE, N.A. **Crop protection agents, their biological evaluation**. London: Academic Press, 1978. p. 251-271.

TIHOHOD, D. **Guia prática de identificação de fitonematoides**. Jaboticabal: FCAV; FAPESP, 1997. 246 p.

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

WAGGONER P.E.; BERGER R.D. Defoliation, disease, and growth. **Phytopathology**, St Paul, v. 77, n. 3, p. 393-398. 1987.

WALLACE, H.R. **Nematode ecology and plant disease**. London: Edward Arnold, 1971. 228 p.

WARD, K.; SCARTH, R.; DAUN, J.; VESSEY, J.K. Chlorophyll degradation in summer oilseed rape and summer turnip rape during seed ripening. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 75, n. 2, p. 413-420, 1995.

WEISCHER, B.; BROWN, D.J.F. **Conhecendo os nematóides:** nematologia geral. Sofia: Pensoft, 2001. 209 p.

WIEBOLD, B. **Premature deaf causes green soybean seeds**. Missouri, 2008. Disponivel em: <http://www.psu.missouri.edu/soyx/soydocs/greenseedcolor.pdf>. Acesso em 02 out. 2010.

WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell,** Rockville, v. 8, n. 10, p. 1735-1745, 1996

WYSS, U.; GRUNDLER, F.M.W.; MUNCH, A. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in root of *Arabidopsis thaliana*. **Nematologica**, Leiden, v. 38, n. 1, p. 98-111, 1992.

YANG, J.; ZHANG, J.; WANG, Z.; ZHU, Q.; LIU, L. Water deficit-induced senescence and its relationship to the remobilization of pre-stored carbon in wheat during grain filling. **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, n. 1, p. 196-206, 2001.

YONEYA F. Soja: rotação contra nematoides. **O Estado de São Paulo,** 2008. Disponível em: <www.estadao.com.br/noticias/suplementos,soja-rotacaocontra-nematoides,120312,0.htm>. Acesso em: 10 abr. 2012.

ZORATO, M.F. **O reflexo da presença de sementes esverdeadas na qualidade fisiológica em soja**. 2003. 84 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

ZORATO, M.F.; WATANABE, P.A.T. Soja esverdeada: a degradação parcial da clorofila. In: SUZUKI, S.; YUYAMA, M.M.; CAMACHO, S.A. **Boletim de pesquisa de soja 2006**. Rondonópolis: Fundação MT, 2006. p. 229-232.

ZORATO, M.F.; PESKE, S.T.; TAKEDA, C.; FRANCA NETO, J.B. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 1, p. 11-19, 2007.