

**FATORES ENVOLVIDOS NA ADESÃO E
INFECTIVIDADE DE *Pasteuria penetrans* (Thorne,
1940) Sayre e Starr, 1985, EM *Meloidogyne* spp.**

CLEBER MAXIMINIANO

2000

CLEBER MAXIMINIANO

**FATORES ENVOLVIDOS NA ADESÃO E
INFECTIVIDADE DE *Pasteuria penetrans* (Thorne, 1940)
Sayre e Starr, 1985, EM *Meloidogyne* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. VICENTE PAULO CAMPOS

LAVRAS

MINAS GERAIS-BRASIL

2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Maximiniano, Cleber

Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria penetrans* (Thorne, 1940) Sayre e Starr, 1985, em *Meloidogyne* spp. / Cleber Maximiniano. --
Lavras : UFLA, 2000.

136 p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Pasteuria*. 2. Adesão. 3. Infectividade. 4. *Meloidogyne*. 5. pH. 6. Enzima. 7. Matéria orgânica. 8. Flutuação populacional. 9. Substrato. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-595.182

-595.767

-632.96

CLEBER MAXIMINIANO

**FATORES ENVOLVIDOS NA ADESÃO E INFECTIVIDADE DE
Pasteuria penetrans (Thorne, 1940) Sayre e Starr, 1985, EM
Meloidogyne spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.


APROVADA em 04 de agosto de 2000

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA


Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICATÓRIA

Ao Sr. Sebastião Maximiniano e Sra. Nathércia de Jesus e Silva

Ofereço

A

Jéssica Zabalde Maximiniano

e

Maria José Zabalde Portela Maximiniano

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização desse curso.

Ao Prof. Dr. Vicente Paulo Campos pelo incentivo e orientação.

Aos Professores Ricardo Magela de Souza e Edson Ampélio Pozza pelos ensinamentos.

Ao Anderson Resende de Almeida e Tarlei Luiz de Paula pela ajuda na coleta de amostras e extrações de fitonematóides.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFLA, pela amizade.

Aos amigos, João, Jorge, Rose, Fábio, Mauro, Fernando, Sonia, Cacilda, Wirton, Andrei, Flávio, Sebastião Márcio, Leimi, Alessandra, Kátia, Bernardo, Marcos Roberto, pelos bons momentos.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii

CAPÍTULO 1: Parasitismo e infectividade de *Pasteuria penetrans*: fatores envolvidos.....

1 Introdução Geral.....	2
2 Referencial Teórico.....	4
2.1 Histórico.....	4
2.2 Adesão ao hospedeiro.....	6
2.3 Especificidade de <i>Pasteuria</i> spp. em fitonematóides.....	8
2.4 A natureza da adesão.....	9
2.5 O efeito da temperatura na adesão.....	13
2.6 O pH e o tempo de exposição.....	14
2.7 A textura do solo.....	15
2.8 Substancias que afetam a adesão.....	17
2.9 Flutuação populacional de <i>Meloidogyne</i> spp. associadas a <i>Pasteuria</i> spp.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

CAPÍTULO 2: Efeito do pH na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em juvenis de *Meloidogyne javanica*.....

1 Resumo.....	34
2 Abstract.....	35
3 Introdução.....	36
4 Material e Métodos.....	38

4.1 Obtenção dos endósporos.....	38
4.2 Obtenção dos juvenis do segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne javanica</i>	38
4.3 Preparo das soluções-tampão de fosfato de sódio.....	39
4.4 Montagem e avaliação do ensaio.....	39
5 Resultados e Discussão.....	41
6 Conclusões.....	44
7 Referências Bibliográficas.....	45

CAPÍTULO 3: efeito de enzimas na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*

1 Resumo.....	48
2 Abstract.....	49
3 Introdução.....	50
4 Material e Métodos.....	52
4.1 Experimento 1: efeitos da pectinase e celulase na adesão de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i>.....	52
4.1.1 Obtenção dos endósporos.....	52
4.1.2 Obtenção dos juvenis do segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne javanica</i>	52
4.1.3 Montagem do ensaio.....	53
4.2 Experimento 2: efeito do pré-tratamento dos endósporos e da concentração de pectinase	54
4.2.1 Obtenção dos endósporos e juvenis.....	54
4.2.2 Montagem do ensaio.....	54
4.3 Experimento 3: efeito do tratamento de endósporos com pectinase e calor..55	55
4.3.1 Obtenção dos endósporos e juvenis.....	55
4.3.2 Montagem do ensaio.....	55
5 Resultados e Discussão.....	58

5.1 Experimento 1: efeitos da pectinase e celulase na adesão de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i>	58
5.2 Experimento 2: efeito do pré-tratamento dos endósporos e da concentração de pectinase.....	59
5.3 Experimento 3: efeito do tratamento de endósporos com pectinase e calor..	60
6 Conclusões.....	62
7 Referências Bibliográficas.....	63

CAPÍTULO 4: Efeito de filtrados rizobacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*.....

1 Resumo.....	66
2 Abstract.....	67
3 Introdução.....	68
4 Material e Métodos.....	70
4.1 Obtenção dos filtrados.....	70
4.2 Obtenção dos juvenis de segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne javanica</i>	70
4.3 Obtenção dos endósporos.....	71
5 Resultados e Discussão.....	73
6 Conclusões.....	75
7 Referências Bibliográficas.....	76

CAPÍTULO 5: Influência das raças de *Meloidogyne incognita* na infectividade de *Pasteuria penetrans*.....

1 Resumo.....	79
2 Abstract.....	80
3 Introdução.....	81
4 Material e Métodos.....	83
4.1 Obtenção dos endósporos.....	83

4.2 Obtenção dos inóculos de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Meloidogyne javanica</i> ..	83
4.3 Preparo dos vasos.....	84
4.4 Avaliação.....	84
5 Resultados e Discussão.....	86
6 Conclusões.....	88
7 Referências Bibliográficas.....	89
CAPÍTULO 6: Efeito de solo argiloso e substratos orgânico e mineral na adesão de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i>	91
1 Resumo.....	92
2 Abstract.....	93
3 Introdução.....	94
4 Material e Métodos.....	96
4.1 Experimento 1: efeito de substratos na adesão de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i> a juvenis dos segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne javanica</i>	96
4.1.1 Obtenção dos juvenis.....	96
4.1.2 Obtenção dos endósporos.....	96
4.1.3 Montagem do ensaio.....	97
4.2 Experimento 2: efeito de substratos e da concentração de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i> na adesão a juvenis dos segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne javanica</i>	98
4.2.1 Obtenção dos juvenis e endósporos.....	98
4.2.2 Montagem do ensaio.....	98
5 Resultados e Discussão.....	100
5.1 Experimento 1: efeito de substratos na adesão de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i> a juvenis dos segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne javanica</i>	100
5.2 Experimento 2: efeito de substratos e da concentração de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i> na adesão a juvenis dos segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne javanica</i>	101

6 Conclusões.....	107
7 Referências Bibliográficas.....	108

CAPÍTULO 7: Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em área naturalmente infestada por *Pasteuria penetrans*.....

1 Resumo.....	111
2 Abstract.....	112
3 Introdução.....	113
4 Material e Métodos.....	115
5 Resultados e Discussão.....	117
6 Conclusões.....	123
7 Referências Bibliográficas.....	124
8 Anexos.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BME	Beta-mercapto-etanol
CON A	Concanavalina A
cm	Centímetro
J2	Juvenil do segundo estágio de <i>Meloidogyne</i> spp.
$K_2 H PO_4$	Fosfato dibásico de potássio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
$Mg SO_4$	Sulfato de magnésio
$Na_2 H PO_4$	Fosfato dibásico de sódio
$Na H_2 PO_4$	Fosfato monobásico de sódio
Na OH	Hidróxido de sódio
pH	Poder hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
USDA	United States Department of Agriculture
μm	Micrômetro
μ	Micron
WGA	Aglutinina do gérmen do trigo

RESUMO

MAXIMINIANO, C. Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria Penetrans* em *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. 136 p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

A adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne javanica* foi estudada em diversos níveis de pH, de 2,5 a 6,5; tempo de borbulhamento de ar; concentração de endósporos; na presença das enzimas pectinase e celulase,[†] e de filtrados rizobacterianos; na presença de substratos como argila, areia, esterco bovino e crotalaria moída. Estudou-se também a flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* associada a *Pasteuria penetrans* em cafeeiros no campo, e a especificidade de *Pasteuria penetrans* em diferentes raças de *Meloidogyne incognita*. A adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* foi sempre maior com o aumento do pH. Vinte e quatro horas de borbulhamento e 10^6 endósporos por tubo proporcionaram maiores adesões de endósporos em J₂ de *Meloidogyne javanica*. A pectinase reduziu a adesão, com maior efeito quando os endósporos e os J₂ foram tratados simultaneamente com essa enzima, porém a celulase foi indiferente. Todos os filtrados bacterianos reduziram a adesão de endósporos em J₂ de *Meloidogyne javanica*, porém com intensidades diferentes entre eles. Maior infectividade de *Pasteuria penetrans* ocorreu em *Meloidogyne javanica*, entretanto, foi diferente entre as raças de *Meloidogyne incognita*, tendo sido maior na raça 4. Os substratos argila, areia, esterco bovino e crotalaria moída reduziram a adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em J₂ de *Meloidogyne javanica*, com maior redução pela argila comparada com areia e esterco bovino. Em outro ensaio, a crotalaria moída reduziu a adesão com maior intensidade do que o esterco curtido. A porcentagem de infestação dos J₂ de *Meloidogyne exigua* por *Pasteuria penetrans* variou de 21 a 65%. O número médio de endósporos/J₂ variou de 2,1 a 9,2 endósporos/J₂, aumentando na primavera. A densidade de J₂ de *Meloidogyne exigua* no solo foi maior em março e abril e variou de 15 a 104/100 cm³ de solo.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

ABSTRACT

MAXIMINIANO, C. Factors involved on adhesion and infectivity of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. 136p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Pasteuria penetrans endospores adhesion to second stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne javanica* was studied at different pH levels, from 2.5 to 6.5; air flushing periods; endospore concentrations; in pectinase and cellulase solutions; in rhizobacterial culture filtrates, in suspension with substrates such as clay, sand, cow manure, and ground crotalaria. Studies were also done on *Meloidogyne exigua* populational fluctuation associated with *Pasteuria penetrans* in coffee field, and on *Pasteuria penetrans* specificity on different races of *Meloidogyne incognita*. *Pasteuria penetrans* endospores adhesion was always greater with the increase of pH. Twenty four hours of air flushing and 10⁶ endospores per glass tube promoted the greatest endospore adhesion to J₂ of *Meloidogyne javanica*. Pectinase solution reduced adhesion of endospores with greater effect when endospores and J₂ were simultaneously treated with the enzyme, but cellulase had no effect. All rhizobacterium isolate filtrates tested reduced adhesion of endospores at different levels on J₂ of *Meloidogyne javanica*, among them. Greater infectivity of *Pasteuria penetrans* occurred in *Meloidogyne javanica* compared to *Meloidogyne incognita*, however the infectivity was different among races of *Meloidogyne incognita*, but it was greater in race 4. Clay, sand, cow manure and ground crotalaria reduced endospore adhesion to J₂ of *Meloidogyne javanica*, with greater adhesion reduction by clay compared to sand and cow manure. In another assay, ground crotalaria greatly reduced adhesion as compared to cow manure. *Meloidogyne exigua* J₂ percentage of infestation by *Pasteuria penetrans* varied from 21 to 65%. The number of endospores per *Meloidogyne exigua* J₂ varied from 2.1 to 9.2, with increasing infestation in spring. *Meloidogyne exigua* J₂ density in soil was high in March and April, varying from 15 to 104/100 cm³ of soil.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

CAPÍTULO 1

Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Pasteuria sp. é uma bactéria parasita obrigatória, à luz do conhecimento atual, que tem como hospedeiros os nematóides parasitos de planta, dentre outros. Ao final de seu ciclo de vida como parasita, a bactéria produz os endósporos que são a sua forma de persistência no ambiente e a maneira pela qual pode ser encontrada pelo hospedeiro. O seu potencial como agente de controle biológico tem motivado muitas pesquisas no controle de fitonematóides em várias regiões do mundo. O seu modo de ação nos fitonematóides consiste basicamente em: 1- diminuir a capacidade de migração das formas juvenis e adultas dos nematóides hospedeiros no solo, pela carga de endósporos aderidos à cutícula; 2 – diminuir a capacidade de penetração dos endoparasitas nas raízes; 3 – diminuir a produção de ovos pelas fêmeas infectadas. Considerada como hiperparasita, a *Pasteuria* sp. possui com os fitonematóides uma relação de especificidade, na qual poucas espécies ou gêneros são infectados pela mesma população da bactéria. O entendimento dessa relação parasita-hospedeiro é de fundamental importância para aumentar a eficiência da bactéria como agente de controle biológico. O entendimento do processo de adesão de endósporos a nematóides poderá auxiliar na manipulação desse organismo, contudo, a natureza desse mecanismo, apesar de ter sido estudado com ênfase nos últimos anos, ainda não está completamente esclarecida. Os estudos têm mostrado que a especificidade da bactéria para com o nematóide hospedeiro vai além das espécies, atingindo, em graus variados, populações diferentes de fitonematóides. Por outro lado, os fatores que afetam a adesão do endósporo são diversos e ao mesmo tempo não têm sido objeto de muitos estudos. No solo, em condições naturais, onde convivem a *Pasteuria* spp. e os fitonematóides, o ambiente influencia diretamente sob a ação de fatores como a temperatura do solo, o pH, a

textura, umidade, além da microflora presente na rizosfera. Conhecer o efeito de cada um desses fatores na adesão e no parasitismo de nematóides por *Pasteuria* spp. levará ao aumento da eficiência do manejo e melhoria da eficácia do inóculo de *Pasteuria* spp. como um agente bioativo.

Neste trabalho, objetivou-se estudar: a) os efeitos do pH, da pré-incubação dos endósporos e de juvenis em enzimas e filtrados rizobacterianos, e também da adsorção em matéria orgânica e solo, sobre a adesão do endósporo à cutícula de juvenil do segundo estágio de *Meloidogyne* sp.; b) estudar a influência da variabilidade do hospedeiro, através das raças 1, 2, 3, e 4 de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949 e *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, na infectividade de *Pasteuria* sp., em casa de vegetação. c) estudar também a flutuação populacional de *Pasteuria* sp. associada a *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, em cafezal naturalmente infestado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

Pasteuria penetrans (Thorne, 1940) Sayre e Starr, 1985, é uma bactéria gram-positiva, mesófila em relação à temperatura (Hatz e Dickson, 1992; Serracin et al., 1997), que ao infectar o seu hospedeiro cresce vegetativamente através de micélio septado com ramos dicotômicos (Mankau e Imbriani, 1975), e que no final do ciclo vegetativo produz endósporos, responsáveis pela sua resistência, manutenção e disseminação no solo. Foram caracterizadas quatro espécies quanto às características de desenvolvimento e morfologia dos endósporos (Sayre e Starr, 1989). *Pasteuria ramosa* Metchnikoff, 1888, é a espécie tipo e tem como hospedeira a pulga aquática *Daphnia magna* Strauss, (Sayre e Starr, 1985). *Pasteuria penetrans* tem como hospedeira *Meloidogyne incognita* (Sayre e Starr, 1989), e *Pasteuria thornei* Starr e Sayre, 1988, infecta *Pratylenchus brachyurus* (Sayre e Starr, 1989). *Pasteuria nishizawae* Sayre et al., 1991, infecta os nematóides dos cistos *Heterodera* spp. e *Globodera rostochiensis* (Sayre et al., 1991). A *Pasteuria penetrans* tem mostrado grande potencial como agente de controle biológico contra o nematóide das galhas (Canning, 1973; Sayre, 1980; Stirling, 1984; Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1990; Chen e Dickson, 1998; Souza e Campos, 1997; 1999). Porém, com os seus endósporos imóveis, a eficácia da bactéria é parcialmente relacionada à sua concentração e distribuição no solo (Davies, Kerry e Flynn, 1988; Miranda e Marbán-Mendoza, 1999), e à chance de contato com juvenis do segundo estágio movendo-se em direção ao hospedeiro (Ratnasoma, Gowen e Hague, 1991).

O gênero *Pasteuria* sp. foi estabelecido por Metchnikoff (1888), citado por Chen e Dickson (1998), como um parasito da pulga aquática *Daphnia*

magna Straus. Entretanto, o primeiro relato de um parasito semelhante infectando um nematóide foi feito por Cobb (1906), citado por Sayre e Starr (1989), que pensou tratar-se de um esporozoário. *Pasteuria* sp. permaneceu por sete décadas, integrada à classe *sporozoa*. Nesse período ocorreram, no Brasil, as primeiras observações do parasitismo de *Pasteuria* sp. em fitonematóides, quando foi descrita parasitando *Xiphinema campinense* (Lordello, 1951), e em 1966 em *Meloidogyne* sp. (Lordello, 1966). A polêmica acerca da taxonomia dessa bactéria foi retomada por Micoletzky (1925), citado por Sayre e Starr (1989), dando o nome genérico de *Duboscqia* Perez, 1908, ao organismo semelhante, parasitando nematóides de vida livre, o que foi aceito por Thorne (1940), o qual descreveu a espécie como *Duboscqia penetrans*, percebendo a semelhança com o parasito encontrado em *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev, sinonimizado como *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Stekhoven. Mas foi Mankau (1975) que ao examiná-la sob o microscópio eletrônico, colocou-a entre as bactérias, denominando-a de *Bacillus penetrans*. No entanto, ao estudar o seu ciclo de vida, Sayre e Starr (1985) chamaram a atenção para a semelhança entre *Bacillus penetrans* com o actinomiceto *Pasteuria ramosa*, descrito por Metchnikoff em 1888 (Chen e Dickson, 1998), e então chamaram-na de *Pasteuria penetrans*. Em estudo realizado na Flórida por Anderson et al. (1999), o rDNA 16S de *Pasteuria penetrans*, proveniente dos isolados P-100 e P-20, foi seqüenciado através da amplificação em PCR e mostrou 93% de similaridade de bases com aquele de *Pasteuria ramosa*, anteriormente seqüenciado por Ebert et al. (1996), citado por Chen e Dickson (1998). Isso reforça a idéia de que os dois organismos pertencem ao mesmo gênero, segundo a classificação de Strackebrandt e Liesack (1993), citados por Anderson et al. (1999). Uma seqüência de 1341 pares de bases de uma espécie de *Pasteuria* Metchnikoff, 1888, que parasita *Heterodera glycines*, foi determinada e comparada à seqüência homóloga de *Pasteuria ramosa* e mostrou

o mesmo índice de 93% de similaridade. Os resultados mostraram que a *Pasteuria* que infecta *Heterodera glycines*, e *Pasteuria ramosa*, formam uma linha distinta de descendentes dentro de *Alicyclobacillus*, grupo de *Bacillaceae*, concordando com o ponto de vista de que *Pasteuria* é um membro do ramo de *Clostridium-Bacillus-Streptococcus*, ramo das eubactérias gram-positivas (Atibalentja, Noel e Domier, 2000).

2.2 Adesão ao hospedeiro

A adesão do endósporo de *Pasteuria* sp. à cutícula do nematóide é um processo físico-bioquímico, e constitui o primeiro evento do seu parasitismo. Endósporos de *Pasteuria* spp. têm sido observados em muitos gêneros e espécies de nematóides; entretanto, os endósporos de uma população individual se aderem a um número limitado de gêneros e/ou espécies. Segundo Davies, Kerry e Flynn (1988), a habilidade dos endósporos para aderir ao juvenil do nematóide das galhas tem tido uma correlação positiva com a população do nematóide, na qual os endósporos foram produzidos. Por outro lado, Giannakou et al. (1999) verificaram que a planta não afeta a compatibilidade dos endósporos com o nematóide. Apenas a capacidade de se aderir ao nematóide não dá a este o status de hospedeiro. Caracteriza-se o hospedeiro quando ocorre a infecção que deve seguir à aderência do endósporo ao nematóide e à penetração na cutícula, do tubo germinativo. Apenas 20% dos endósporos aderidos ao nematóide no interior da raiz mostraram alguma mudança estrutural, indicando a germinação e a infecção de *Pasteuria penetrans* (Sayre e Wergin, 1977; Rao et al., 1997). Além disso, Ratnasoma, Gowen e Hague (1991) verificaram que endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos a juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* spp. foram destacados das suas cutículas, quando colocados em solo úmido ou água. A especificidade da bactéria para

com o hospedeiro foi primeiro observada por Mankau e Prasad (1977), ao notarem que o exosporium ou parede do esporângio deveria ter alguma função na adesão do endósporo à cutícula do nematóide. Segundo Mankau e Imbriani (1975) e Sayre e Wergin (1977), o endósporo de *Pasteuria* spp. é, na verdade, um esporângio contendo no centro o endósporo esférico, que por sua vez é circundado pela matriz periférica, composta de microfibrilas estendidas e envolta pela membrana denominada exosporium. Essa densa capa que envolve o endósporo confere resistência ao calor e à dessecação, além de estar envolvida no processo de adesão ao nematóide (Figura 1).

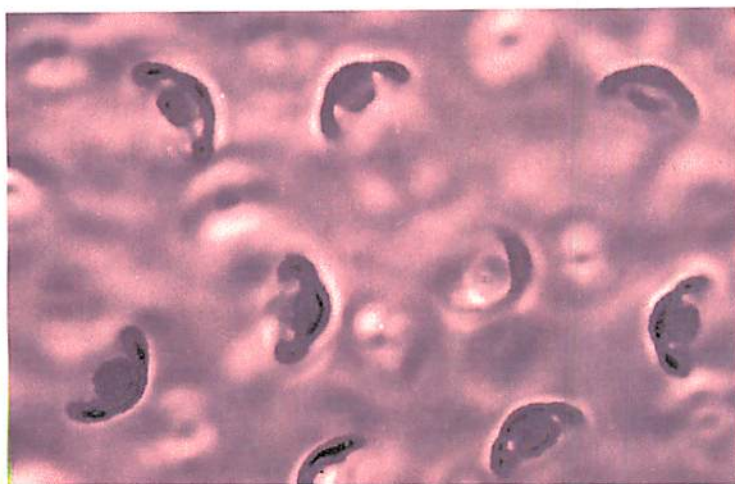


FIGURA 1- Endósporos de *Pasteuria penetrans* liberados de fêmea de *Meloidogyne* sp.

No entanto, endósporos fragmentados são capazes de aderirem à cutícula de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* sp., conforme foi constatado por

Persidis et al. (1991). Da mesma forma, endósporos destituídos do exosporium são capazes de adesão, conforme verificaram Stirling, Bird e Cakurs (1986) e Davies, Kerry e Flynn (1988), através da técnica de sonificação. Stirling, Bird e Cakurs (1986) verificaram que endósporos submetidos à sonificação tiveram a adesividade aumentada, sugerindo que a remoção do exosporium expõe as fibras da matriz periférica, promovendo maior contato com a cutícula do nematóide. Com esta técnica, Orui (1997) também verificou que a adesividade aumentou com o tempo de sonificação, alcançando o ponto ótimo aos 30 minutos, confirmando que a remoção da parede do esporângio parece ser um fator importante na adesão de endósporos a juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp. A sonificação dos endósporos aumentou a adesividade de três populações de *Pasteuria penetrans* estudadas, sem mudar o espectro de espécies hospedeiras de *Meloidogyne* spp. (Orui, 1997).

2.3 Especificidade de *Pasteuria* spp. em fitonematóides

Os endósporos de *Pasteuria* spp. são capazes de aderir em muitas espécies de nematóides; porém, uma população individual da bactéria possui uma estreita faixa de hospedeiros, e algumas são altamente específicas (Dutky e Sayre, 1978). Assim sendo, as adesões dos endósporos de determinada população de *Pasteuria* sp. à cutícula dos nematóides são específicas para o hospedeiro do qual se tornou parasita (Davies e Redden, 1997). Stirling (1985) havia estudado a especificidade de quatro populações de *Pasteuria penetrans* a juvenis do segundo estágio provenientes de quinze populações do nematóide das galhas, incluindo *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. hapla*, e verificou que a população de *Pasteuria penetrans* da Califórnia, USA, aderiu à cutícula dos juvenis de doze populações de *Meloidogyne* spp. e em dez delas foram encontradas fêmeas infectadas com endósporos, enquanto as três populações de

Pasteuria penetrans provenientes da Austrália foram mais especializadas, infectando apenas três ou quatro das populações de *Meloidogyne* spp. Baseado em testes de adesão de endósporos e no parasitismo em fêmeas, o isolado P1-UFLA, originário do município de Lavras, MG, apresentou porcentagem de infestação e porcentagem de parasitismo diferenciadas às populações de *Meloidogyne javanica* ou espécies de *Meloidogyne* (Souza, 1997). Em testes de adesão a juvenis do segundo estágio (J₂) *in vitro*, dois isolados de *Pasteuria penetrans*, originários da Flórida, USA, diferiram na especificidade a seis populações de *Meloidogyne* spp. do Brasil, indicando capacidades diferentes de adesão a populações diferentes de *Meloidogyne* (Carneiro et al., 1999). Por outro lado, plantas diferentes, com as mesmas populações de *Pasteuria* sp. e *Meloidogyne javanica*, não afetaram a compatibilidade do endósporo com o nematóide, mas a qualidade da infecção ou número de endósporos produzidos por fêmea de *Meloidogyne javanica* foi maior em quiabeiros do que em tomateiros (Giannakou et al., 1999).

A adesão ao hospedeiro significa apenas uma preferência por ele, ou um incidente físico-bioquímico, uma vez que a infecção pode não ocorrer. Sob esse aspecto, a especificidade deveria ser baseada no parasitismo ocorrido no hospedeiro (Chen e Dickson, 1998).

2.4 A natureza da adesão

Segundo Chen e Dickson (1998), a verdadeira natureza da preferência entre isolados de *Pasteuria penetrans* por determinado hospedeiro ainda permanece sem ser elucidada. A maneira pela qual os esporos se aderem à cutícula do nematóide é ainda pouco entendida. Em primeiro lugar, as forças eletrostáticas entre a cutícula do nematóide e a superfície do endósporo deveriam repelir a adesão, pelo fato de que em ambas as superfícies possuem

cargas negativas, segundo Afolabi, Davies e O'Shea (1995). A parede do corpo dos nematóides é composta de cutícula, hipoderme e musculatura somática (Eisenback, 1985). A cutícula é a camada mais externa, com espessura de 0,3-0,4 μm nos juvenis de segundo estágio e 4-6 μm nas fêmeas adultas, e é não-celular, elástica e tri-laminada, sendo a camada mais externa denominada de camada cortical. Externamente à camada cortical, localiza-se a epicutícula, que visualizada por microscopia eletrônica, aparece como uma capa felpuda, chamada por alguns pesquisadores de glicocálix e, por outros, de capa superficial (Spiegel e McClure, 1995). Essa capa superficial contém proteínas, lipídeos e carboidratos como componentes individuais e complexos de glicolipídeos ou lipoproteínas (Spiegel e McClure, 1995). Estudos recentes têm sugerido que proteínas que compõem as superfícies do juvenil de segundo estágio e do endósporo de *Pasteuria penetrans* podem estar envolvidas no processo de adesão (Davies, Redden e Pearson, 1994). Esses estudos têm investigado o papel quantitativo e da natureza das proteínas na superfície dos endósporos de diferentes populações de *Pasteuria penetrans*. Davies, Robinson e Laird (1992) caracterizaram três populações de *Pasteuria penetrans* com especificidade diferente a *Meloidogyne* spp., comparando a natureza e a quantidade das proteínas extraídas da superfície dos endósporos, usando eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS), Western Blotting e teste ELISA. Os autores observaram que as populações mostraram-se distintas na quantidade e natureza de suas proteínas constituintes. Segundo Davies e Danks (1992), a natureza da cutícula do juvenil de segundo estágio e sua interação com os endósporos de *Pasteuria* spp. é de fundamental importância no entendimento da especificidade entre o nematóide e a bactéria. Concordando com isso está o fato de que endósporos de *Pasteuria penetrans* aderem a juvenis do segundo estágio, mas não a adultos da mesma espécie de *Meloidogyne*, mostrando que mudanças químicas ocorreram na

cutícula por ocasião das ecdises, envolvendo o reconhecimento à adesão. Frações solúveis e insolúveis em β -mercaptoetanol (BME), extraídas das cutículas de juvenis de segundo estágio e de fêmeas adultas de *Meloidogyne incognita*, mostraram possuir na constituição da cutícula desses dois estádios, 12 e 9 tipos de colágenos, respectivamente, com pesos moleculares diferentes segundo caracterização em eletroforese, e diferindo também na composição de aminoácidos. As proteínas solúveis em BME, extraídas da cutícula de juvenis, foram caracterizadas como glicoproteínas em 7 dos 12 tipos encontrados, enquanto nenhuma glicoproteína foi detectada na fração obtida de fêmeas adultas (Reddigari et al., 1986). A cutícula de *Meloidogyne incognita* contém proteínas do tipo colágeno, com distribuição ao longo de toda camada externa e com alta concentração de glicina, alanina, cisteína e prolina, e que se interligam umas às outras e a outros componentes cuticulares através de pontes dissulfeto (Reddigari et al., 1986; Hussey e Jansma, 1988). De acordo com Stryer (1992), as proteínas são capazes de interagir especificamente com uma faixa tão ampla de moléculas porque são altamente eficientes em formar superfícies e fendas complementares. O rico repertório de cadeias laterais nessas superfícies e nessas fendas permite às proteínas formarem pontes de hidrogênio, ligações eletrostáticas e de van der Waals com outras moléculas. Já as pontes dissulfeto permitem interligações entre cadeias ou entre partes de uma cadeia através da oxidação de radicais de cisteína.

A natureza protéica da cutícula de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria* e *Meloidogyne javanica* foi estudada também por Davies e Danks (1992), que observaram um grande número de proteínas conservadas ou com o mesmo peso molecular no perfil de eletroforese entre as espécies, porém o perfil eletroforético de *M. arenaria* foi substancialmente diferente das outras espécies. Segundo os autores, a predominância protéica da cutícula dos nematóides deve facilitar a interação

com a N-acetil-glucosamina da superfície dos endósporos. A presença de resíduos de carboidratos como N-acetil-glucosamina, manose ou glicose, na superfície dos endósporos de *Pasteuria penetrans*, foi demonstrada por Davies e Danks (1993) e Persidis et al. (1991). Esses resíduos de carboidratos podem ser candidatos à interligação com a superfície dos nematóides (Spiegel, Mor e Sharon, 1996). De acordo com Davies, Robinson e Laird (1992), poderiam existir mecanismos diferentes de reconhecimento e adesão, provenientes de substâncias diferentes presentes na cutícula do nematóide e na superfície do endósporo. Em um experimento conduzido em 1992, Davies et al. testaram um anticorpo policlonal, produzido contra uma população de *Pasteuria* sp., que mostrou diferenças quantitativas na atividade entre o anticorpo e a superfície do endósporo de outras três populações de *Pasteuria* sp., através da inibição diferenciada da adesão do endósporo à cutícula do nematóide. Segundo os autores, diferenças quantitativas e qualitativas nas proteínas presentes na superfície do nematóide e do endósporo poderiam ser responsáveis pela diferença na especificidade ao hospedeiro. Por outro lado, a implicação de carboidratos e de sítios de reconhecimento a carboidratos no processo de adesão foi demonstrada por Spiegel, Mor e Sharon (1996), através do pré-tratamento de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* com as lectinas concanavalina A (CON A) e aglutinina do germem do trigo (WGA). Anticorpos monoclonais têm sido produzidos contra populações de *Pasteuria* sp através da técnica de imunofluorescência, que consiste na produção do anticorpo diretamente na superfície do endósporo, pelas células híbridomas previamente produzidas. Com a imersão na substância fluorescente, o isotiocianato, que se liga ao anticorpo produzido pelas híbridomas, a técnica permite reconhecimento em várias populações de *Pasteuria* sp., quando o anticorpo produzido é específico e se liga ao endósporo (Davies, Redden e Pearson, 1994; Davies e Redden, 1997). Os resultados sugerem que a distribuição de algum epitopo

particular difere não somente entre os endósporos diferentes, mas também entre populações diferentes de *Pasteuria* sp., e que a variabilidade biológica presente na superfície do endósporo é maior do que se supunha até então, sendo na verdade subestimada com os testes de adesão realizados com os endósporos aos nematóides (Davies e Redden, 1997). Segundo os autores, com a descoberta do epitopo 117, o qual é reconhecido pelo anticorpo PP1/117, e com os testes de degradação química desse epitopo 117 com NaOH ou proteinase K, sugere-se o envolvimento de uma glicoproteína na ligação e que talvez esse epitopo tenha aspectos de conformação em sua natureza. Ao produzirem um anticorpo monoclonal contra juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incógnita*, Esnard et al. (1997) verificaram redução na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*, o que implica na presença de uma proteína específica na camada superficial do nematóide como fator de adesão ao endósporo. Ao bloquearem as cargas negativas na superfície do juvenil com ferritina cationizada, em conjugação com o anticorpo monoclonal, observaram uma redução adicional na adesividade do endósporo quando comparada com o tratamento contendo só o anticorpo. Isto sugeriu que a alteração de carga do epitopo cuticular, pela mudança de pH por exemplo, influencia a adesão.

2.5 O efeito da temperatura na adesão

Vários fatores têm demonstrado a capacidade de afetar a adesão do endósporo ao nematóide. Entre eles, estão relacionados, por exemplo, a temperatura, o pH e a textura do solo. No entanto, poucos estudos têm sido conduzidos para se verificar o efeito desses fatores na adesão do endósporo à cutícula do nematóide. Stirling (1981) verificou que o número de endósporos aderidos a *Meloidogyne javanica* aumentava à medida que a temperatura crescia de 15°C para 30°C e o tempo de exposição aumentava de 24 para 72 horas.

Concordando com isso, Hatz e Dickson (1992) e Freitas, Mitchell e Dickson (1997) verificaram que a temperatura ótima para a adesão de endósporos de *Pasteuria* sp. a juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne arenaria*, estava em torno de 30°C. Freitas, Mitchell e Dickson (1997) verificaram que a adesão foi mínima na temperatura de 60°C ou superior. Segundo os autores, as temperaturas altas podem causar a solubilização ou a desnaturação dos sítios de reconhecimento da proteína, na superfície da cutícula do nematóide, e os sítios de N-acetil-glicosamina na superfície dos endósporos, os quais podem estar envolvidos no processo de adesão.

2.6 O pH e o tempo de exposição

O'Brien (1980) pela primeira vez, verificou que a adesão do endósporo não era afetada pelo pH no intervalo de 4,5 a 8,5. Foi então que Davies, Kerry e Flynn (1988) estudaram o efeito do pH em água destilada e de torneira em suspensões de endósporos com os pH ajustados para 4, 7 e 9, submetidos à sonificação em concentração uniforme de 10^6 endósporos/mL, em juvenis de *Meloidogyne incognita*, e verificaram que a maior adesão ocorreu no pH igual a 7. Ratnasoma e Gowen (1996) estudaram o efeito do pH em suspensões de endósporos ajustadas para $0,8 \times 10^5$ endósporos/mL e os pH ajustados para 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 com a adição de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* e verificaram que melhor adesão ocorria em pH acima de 4, com o ponto ótimo em 5. Orui (1997) estudou o efeito do pH ajustados para 4, 6 e 8 em suspensões de endósporos de *Pasteuria penetrans* de 2×10^5 /mL, concomitante ao tempo de sonificação dos endósporos de 0, 5, 10, 20, 30, e 50 minutos, e verificou que o pH ótimo para a adesão de endósporos submetidos à sonificação foi de 8,0. Afolabi, Davies e O'Shea (1995) constataram a existência de uma maior rede de carga negativa na superfície do endósporo com pH neutro, e

consequentemente maior potencial eletrostático nesse pH e redução das cargas negativas quando o pH se afastava do neutro.

Slana e Sayre (1982) estudaram a influência de alguns fatores físicos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis de *Meloidogyne incognita* e concluíram que o borbulhamento através de injeção de ar proporcionou a maior taxa de adesão. O borbulhamento da suspensão de endósporos e juvenis evita o efeito de outra variável no processo de adesão de endósporos em nematóides, que é a movimentação desse hospedeiro na direção do endósporo, fazendo com que a adesão seja apenas o resultado da interação do endósporo e do hospedeiro, como comentado anteriormente. Miranda e Marbán-Mendoza (1999) estudaram o efeito do tempo de exposição de endósporos de *Pasteuria penetrans* e *Meloidogyne incognita* ou *Meloidogyne arabicida*, em concentração uniforme de endósporos igual a 10^6 /mL de suspensão, e verificaram que a adesão aumentou com o tempo de exposição entre a bactéria e os juvenis. Davies, Kerry e Flynn (1988) estudaram o tempo de exposição de 2, 4, 6, 12 ou 24 horas entre juvenis de *Meloidogyne* spp., e verificaram que a adesão aumentou à medida que o tempo de exposição aumentou para 24 hs na concentração de 10^5 /mL ou para 12 hs na concentração de 10^6 /mL. Em outro teste verificaram que sob o período de exposição de 24 hs a 72 hs, não houve efeito sobre o número de endósporos aderidos. Adiko e Gowen (1999) testaram o tempo de exposição para 2, 6, 9, e 17 dias em duas concentrações de endósporos, 3×10^4 e 10^5 /g de solo, e verificaram que a carga de endósporos nos juvenis de *Meloidogyne incognita* aumentou com o tempo de exposição e na proporção da concentração dos endósporos. Segundo os autores, a exposição a 10^5 endósporos/g de solo resultou em maior porcentagem (94%) de juvenis carregados com pelo menos 10 endósporos.

2.7 A textura do solo

Spaull (1984) verificou que a proporção de juvenis de *Meloidogyne* infestados com endósporos de *Pasteuria* sp. é maior em solos arenosos do que em solos argilosos. A capacidade de movimentação de juvenis em solos arenosos é maior do que em solos argilosos, porque o tamanho dos poros é maior nesses tipos de solo. Concordando com isso, Mateille, Duponnois e Diop (1995) verificaram que o tipo de solo afetou a distribuição da população de *Meloidogyne* spp. entre o solo e as raízes. Por outro lado, o transporte do endósporo de *Pasteuria penetrans* também é influenciado pela textura do solo, por causa do seu pequeno tamanho e de sua imobilidade (Sayre e Wergin, 1977; Mateille et al. , 1996). Segundo Oostendorp, Dickson e Mitchell (1990), os solos caracterizados pela textura grosseira, sem partículas de argila, podem favorecer a percolação dos endósporos. Mateille et al. (1996) verificaram, em um experimento, que a percolação dos endósporos através do solo arenoso foi de 67,7%, enquanto no solo argiloso foi de apenas 10,6%. Segundo os autores, a percolação de endósporos de *Pasteuria penetrans* no perfil do solo é mais influenciada pela textura do solo do que a percolação dos juvenis de *Meloidogyne javanica*, e além da percolação, outro fenômeno pode influenciar a perda dos endósporos no solo, que é a adsorção eletroquímica nos colóides. Devido à superfície de carga negativa, os endósporos podem permanecer nas partículas de argila através de pontes catiônicas com Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Por isso, a avaliação da adesão dos endósporos aos nematóides no solo dependerá da carga iônica na solução do solo e da saturação de cátions, bem como do pH. Segundo Mateille, Duponnois e Diop (1995), existem dois efeitos a serem considerados: estrutural e eletrostático. Quando a fração argila é majoritária no solo, esta limita a migração dos juvenis de *Meloidogyne* spp., reduzindo a probabilidade de encontro dos juvenis com os endósporos livres no solo. Por outro lado, aprisiona-os pela adsorção, tornando-os indisponíveis à adesão. Segundo Van

Gundy (1985), a migração de juvenis no solo diminui à medida que as frações de argila e silte aumentam na textura, não ocorrendo migrações em solos com mais do que 30% de argila, além de silte. Ao contrário, os solos de textura grosseira ou arenosa facilitam a migração dos juvenis de *Meloidogyne* spp., aumentando a chance de encontro dos dois organismos. Ferris e McKenry (1974) verificaram que a distribuição espacial de *Meloidogyne* spp. no solo estava amplamente associada com a distribuição de raízes no vinhedo. De acordo com os autores, embora a fonte de alimento fosse muito importante, outros fatores influenciaram a migração de nematóides, como a oxigenação e a porosidade do solo.

2.8 Substâncias que afetam a adesão

Ratnasoma, Gowen e Hague (1991) observaram inicialmente que endósporos de *Pasteuria penetrans* poderiam se desprender da cutícula de juvenis. Verificaram que os endósporos se destacavam da cutícula dos juvenis quando colocados em água destilada ou solo enlameado e que esse desprendimento não ocorria da cutícula de juvenis mortos, sugerindo que isso tenha ocorrido devido ao movimento dos juvenis. Neste caso, os juvenis mortos no solo poderiam sofrer a adesão de endósporos através da percolação, pela água no perfil do solo. Stirling, Bird e Cakurs (1986) já haviam verificado que mesmo os nematóides mortos poderiam sofrer a adesão de endósporos de *Pasteuria* spp., embora o número de endósporos aderidos fosse menor. Souza (1997) verificou que a morte de juvenis de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*, através de tratamento térmico a 60 °C/ 5 minutos, reduzia drasticamente a adesão de endósporos à cutícula. Ao eclodir e movimentar-se no solo, na direção das raízes da planta hospedeira, o juvenil está sujeito a sofrer a ação do ambiente, através de substâncias produzidas pela planta ou pela microflora habitante da rizosfera. O endósporo, por sua vez, recebe a mesma

influência. Duponnois, Netscher e Mateille (1997) verificaram que a microflora associada induziu a uma maior adesão dos endósporos à cutícula de juvenis de *Meloidogyne graminicola*. Em outro experimento, Duponnois e Ba (1998) testaram nove isolados bacterianos obtidos de solo e 14 isolados obtidos de galhas de *Meloidogyne* sp. na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* e verificaram que a maioria dos isolados do solo (8) não alterou a adesividade dos endósporo, enquanto a maioria dos isolados obtidos de galhas (13), aumentou a adesividade. Segundo os autores, a microflora no solo pode modificar o ambiente iônico pelo seu metabolismo e pelos exsudatos radiculares (polissacarídeos), que formam complexos com o colágeno na cutícula do juvenil e peptídeoglicanos na superfície do endósporo, aumentando a adesão à cutícula.

Ratnasoma, Gowen e Hague (1991) testaram o efeito da pectinase no desprendimento de endósporos aderidos em juvenis de *Meloidogyne javanica*, durante 24 horas, e verificaram que cerca de 20% dos endósporos se desprenderam da cutícula. Segundo os autores, isso sugere que algum substrato, possivelmente alguma forma de carboidrato, que pode ser degradada pela pectinase, está envolvida no processo de adesão. As enzimas que degradam as substâncias pécicas são conhecidas como pectinases ou enzimas pectolíticas (Agrios, 1997). Algumas delas, como a pectina metil esterase, remove pequenas ramificações das cadeias da pectina. Outras, como as poligalacturonases, quebram a cadeia pécica, na ligação glicosídica α -1, 4, pela adição de uma molécula de água, produzindo ácido galacturônico ou ácido oligogalacturônico. As liases pécicas ou transeliminases quebram a cadeia nas ligações glicosídicas α -1, 4, na ausência de água, e simultaneamente eliminam um próton do C-5, formando uma ligação insaturada entre o C-4 e C-5. *Aspergillus niger* possui genes que codificam para todas essas enzimas: poligalacturonase, liase pectina e pectina metilesterase (Annis e Goodwin, 1997). Segundo Goto (1992), a parede celular das bactérias gram positivas é uma armação rígida, cujo componente

básico é um heteropolímero chamado peptidoglicano, que é encontrado em quase todas as bactérias, exceto *Mycoplasma* e *Halobactéria* (Dawes e Sutherland, 1980), e que consiste de cadeias alternadas de N-acetil-glucosamina e ácido N-acetil-murâmico e um peptídeo curto ligando as cadeias. Uma grande variedade de organismos gram positivos tem sido examinada, e tem se verificado que a sequência de aminoácidos nas subunidades peptídicas varia de um organismo para outro (Moat, 1979). Segundo os autores, a natureza das subunidades peptídicas e as pontes de ligações entre as cadeias determina o grau de susceptibilidade a enzimas líticas do peptidoglicano. Além disso, as gram-positivas contêm polissacarídeos, ácido teicoico e às vezes proteínas, sendo a composição dos peptidoglicanos diferente entre os membros de actinomicetes (Goto, 1992). Agentes desnaturantes como o dodecilsulfato de Sódio (SDS), ou β -mercaptoetanol (BME), e as enzimas glicolíticas (α glucosidase, N acetilglucosaminidase, hialuronidase, mutanolisina, quitinase, β -galactosidase, muramidase e ácido periódico), proteolíticas (proteínase K, quimiotripsina, pepsina, tripsina e colagenase) e lipolíticas (lipase), foram testados na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis de *Meloidogyne* sp. e verificou-se aumento na adesão dos endósporos quando submetidos aos agentes desnaturantes, à temperatura ambiente (Davies e Danks, 1993). Na pré-incubação dos juvenis e endósporos com enzimas, verificou-se a redução do índice de adesão nos tratamentos com quitinase, muramidase, proteínase K, pepsina e lipase. Segundo os autores, a redução na adesão verificada após os tratamentos com enzimas glicolíticas e proteolíticas sugere que carboidratos e proteínas, na superfície da cutícula e do endósporo, estão envolvidos no processo de adesão. Spiegel, Mor e Sharon (1996) também obtiveram reduções na adesão com pré incubações em Triton X-100, no açúcar fucose ou em α metil-manosídeo. Os efeitos de suspensões dos fungicidas hymexazol (Tachigaren), fosetyl-Al (Aliette), carbendazin (Bavistin) e trichoderma

(Promot) foram testados e verificou-se que não houve efeito na adesão dos endósporos e na infectividade da *Pasteuria* sp (Melki et al., 1998). No solo, apesar de sofrer a ação de diversas substâncias produzidas pela microflora ou exsudadas pelas raízes das plantas, além da resistência a fatores abióticos, os endósporos de *Pasteuria penetrans* persistem por muitos anos. Segundo Giannakou et al. (1997), suspensões de endósporos podem ser estocadas a frio ou em raízes desidratadas por longos períodos sem perder a capacidade de adesão ao nematóide. Os autores verificaram que endósporos armazenados por 11 anos tiveram a mesma adesividade que endósporos recém produzidos, porém a infectividade foi menor nos endósporos velhos.

2.9 Flutuação populacional de *Meloidogyne* sp. associada a *Pasteuria* spp.

Estudos sobre a flutuação populacional dessa bactéria, associada a *Meloidogyne* spp., em áreas naturalmente infestadas, têm sido realizados em algumas culturas e regiões do mundo (Verdejo-Lucas, 1992; Ciancio, 1995; Souza, Souza e Campos, 1996; Atibalentja et al., 1998; Souza e Campos, 1999). No entanto, as observações até aqui realizadas são insuficientes para o entendimento do mecanismo que governa a relação *Pasteuria*-nematóide na natureza (Atibalentja et al., 1998). Ciancio, Mankau e Mundo-OCampo (1992) estudaram a flutuação populacional de *Helicotylenchus lobus* associada a *Pasteuria penetrans* em solo naturalmente infestado num intervalo de 10 meses, na Califórnia, e encontraram correlação positiva ($r = 0,642$; $P < 0,05$) entre a porcentagem de infestação e o número médio de endósporos por nematóide, porém não foi encontrada correlação entre a densidade populacional mensal e a porcentagem de infestação, que variou de 20% a 60%. Na Itália, Ciancio (1995) investigou o parasitismo de *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne por *Pasteuria* sp. e encontrou que a densidade populacional e a taxa de

parasitismo permaneceram constantes por todo o período. Verdejo-Lucas (1992) estudou a flutuação populacional de *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria* e *Meloidogyne hapla*, associadas a *Pasteuria penetrans* em dois pomares de kiwi, durante 1989 e 1990, e verificou uma tendência na redução do número de juvenis de *Meloidogyne* spp. no solo, no final do segundo ano em ambos pomares. Não foi encontrada correlação entre os números de juvenis no solo e a porcentagem de infestação em qualquer pomar. O número médio de endósporos/juvenil foi sempre baixo e a maioria dos juvenis infestados não tinha mais do que quatro endósporos. Segundo o autor, mais estudos são necessários para verificar se há incremento populacional da *Pasteuria* spp. com o tempo, alcançando equilíbrio com o nematóide. Souza e Campos (1999) estudaram a flutuação populacional de *Meloidogyne* sp. associada a *Pasteuria* sp. em área naturalmente infestada e verificaram que as densidades de juvenis de *Meloidogyne* sp. variaram de 0 a 68 (média = 18,5), com picos populacionais em janeiro, fevereiro, abril e setembro, com a porcentagem de infestação variando de 0 a 50% (média = 11,85) e o número médio de endósporos/juvenil variando de 1,5 a 8 (média = 4,17), concluindo que a bactéria e o hospedeiro pareceram não se encontrar em equilíbrio no solo. Atibalentja et al. (1998) estudaram a dinâmica populacional de *Heterodera glycines* associada a *Pasteuria* sp. em área naturalmente infestada e verificaram que a densidade populacional de juvenis no solo variou em média de 23,5 a 161,3/250 cm³ de solo, com picos em julho e setembro no primeiro ano e em maio e julho no segundo ano. O número médio de endósporos/juvenil variou de 0 a 133 (média = 3,9) e a porcentagem de infestação variou de 0 a 100% (média = 64,4%). O número médio de endósporos/juvenil foi significativamente afetado pelo ano, data de amostragem, raça e a interação entre esses fatores. Foi observada correlação positiva ($r^2 = 0,75$; $P < 0,0001$) entre a porcentagem de infestação e o número médio de endósporos/juvenil. De acordo com o modelo matemático adotado pelos autores

para descrever a dinâmica populacional, verificou-se uma redução na densidade de juvenis com o aumento do número médio de endósporos por juvenil, e que, nas condições do experimento, a *Pasteuria* sp. foi capaz de manter a população de *Heterodera glycines* em equilíbrio.

Aproximadamente 15 espécies de *Meloidogyne* Goeldi têm sido relatadas como parasitas ou associadas ao cafeeiro (Campos, Sivapalam e Gnanapragasam, 1990; Araya e Caswell-Chen, 1995; Campos, 1997). Dentre elas, *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887 que é a mais disseminada nos cafezais do Brasil (Campos, Lima e Almeida, 1985), constitui um dos principais patógenos do cafeeiro na maioria das áreas produtoras de café da América Central e do Sul (Campos, Sivapalam e Gnanapragasam, 1990). Um estudo da flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* foi realizado em cafeeiros, no sul de Minas Gerais, com o objetivo de se conhecer as mudanças na população em função das estações climáticas (Huang, Souza e Campos, 1984).

No Brasil, a bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre e Starr, foi registrada, pela primeira vez, atacando *Meloidogyne javanica* (Lordello, 1966) em material coletado de tomateiros infestados no Sul de Minas Gerais. O primeiro registro de *Pasteuria penetrans* parasitando *Meloidogyne exigua* foi feito na Colômbia, por Baeza-Aragón (1978), observando raízes infestadas de *Coffea arabica*, e no Brasil, por Sharma e Lordello (1992), observando plantações infestadas no Estado de São Paulo. Entretanto, ainda não se estudou a sua flutuação em áreas infestadas por esse nematóide.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIKO, A.; GOWEN, S.R. The parasitic activity of *Meloidogyne incognita* as affected by the dynamics of acquisition of *Pasteuria penetrans* spores. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v.27, p.21-26, June 1999.
- AFOLABI, P.; DAVIES, K.G.; O'SHEA, P.S. The eletrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.244-249, Mar. 1995.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1997. 635p.
- ANDERSON, J.M.; PRESTON, J.F.; DICKSON, D.W.; HEWLETT, T.E.; WILLIAMS, N.H.; MARUNIAK, J.E. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.31, n.3, p.319-325, June 1999.
- ANNIS, S.L.; GOODWIN, P.H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, London, v.103, p.1-14, 1997.
- ARAYA, M.; CASWELL-CHEN, E.P. *Coffea arabica* cvs. Caturra and Catuai Nonhosts to a California isolate of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**, Quincy, v.25, n.2, p.165-171, Dec. 1995.
- ATIBALENTJA, N.; NOEL, G.R.; DOMIER, L.L. Phylogenetic position of the North American isolate of *Pasteuria* that parasitizes the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, as inferred from 16S rDNA sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.50, p.605-613, 2000.

- ATIBALEMENTJA, N.; NOEL, G.R.; LIAO, T.F.; GERTNER, G.Z. Population Changes in *Heterodera glycines* and its Bacterial Parasite *Pasteuria* sp. in Naturally Infested Soil. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.30, n.1, p.81-92, Mar. 1998.
- BAEZA-ARAGÓN, C.A. Parasitismo de *Bacillus penetrans* en *Meloidogyne exigua* establecido en *Coffea arabica*. *Cenicafé*, Chinchiná, v.29, n.3, p.24-27, Jul./Set. 1978.
- CAMPOS, V.P. Controle de doenças: doenças causadas por nematóides. In: RIBEIRO DO VALE, F.X.; ZAMBOLIM, L. (eds). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Editora Universitária, 1997. v.1, p.141-170.
- CAMPOS, V.P.; LIMA, R.D.; ALMEIDA, V.F. Nematóides parasitas do cafeeiro. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.50-58, Jun. 1985.
- CAMPOS, V.P.; SIVAPALAM, P.; GNANAPRAGASAM, N.C. Nematodes parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (eds). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford UK: CAB Internacional, 1990. p.387-429.
- CANNING, E.U. Protozoal parasites as agents for biological control of plant-parasitic nematodes. *Nematologica*, Leiden, v.19, n.4, p.342-348, Aug. 1973.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; FREITAS, L.G.; DICKSON, D.W. Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. *Nematology*, Leiden, v.1, p.267-271, 1999.
- CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.30, n.3, p.313-340, Sept. 1998.

- CIANCIO, A. Density-dependent parasitism of *Xiphinema diversicaudatum* by *Pasteuria penetrans* in a naturally infested field. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.2, p.144-149, Feb. 1995.
- CIANCIO, A.; MANKAU, R.; MUNDO-OCAMPO, M. Parasitism of *Helicotylenchus lobus* by *Pasteuria penetrans* in naturally infested soil. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.1, p.29-35, Mar. 1992.
- DAVIES, K.G.; DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.39, n.1, p. 53-64, Jan. 1993.
- DAVIES, K.G.; DANKS, C. Interspecific differences in the nematode surface coat between *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* related to the adhesion of the bacterium *Pasteuria penetrans*. **Parasitology**, Cambridge, v.105, p. 75-480, 1992.
- DAVIES, K.G.; REDDEN, M. Diversity and partial characterization of putative virulence determinants in *Pasteuria penetrans*, the hyperparasitic bacterium of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.83, n.2, p.227-235, Aug. 1997.
- DAVIES, K.G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals Applied Biology**, Warwickshire, v.112, p.491-501, 1988.
- DAVIES, K.G.; REDDEN, M.; PEARSON, T.K. Endospore heterogeneity in *Pasteuria penetrans* related to adhesion to plant-parasitic nematodes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.19, n.5, p.370-373, Nov. 1994.
- DAVIES, K.G.; ROBINSON, M.P.; LAIRD, V. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.59, n.1, p.18-23, Jan. 1992.

- DAWES, I.W.; SUTHERLAND, I.W. **Basic microbiology**. 2 ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1980. v.4, 185p.
- DUPONNOIS, R.; BA, A.M. Influence of the microbial community of a sahel soil on the interactions between *Meloidogyne javanica* and *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.44, n.4, p.331-343, Aug. 1998.
- DUPONNOIS, R.; NETSCHER, C.; MATEILLE, T. Effect of the rhizosphere microflora on *Pasteuria penetrans* parasitizing *Meloidogyne graminicola*. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.25, n.1, p.99-103, Oct. 1997.
- DUTKY, E.M.; SAYRE, R.M. Some factors affecting infection of nematodes by the bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.10, n.4, p.285, Oct. 1978.
- EISENBACK, J.D. Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males, and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. North Carolina: North Carolina State University Graphics, 1985. cap.6, p. 47-77.
- ESNARD, J.; McCLURE, M.A.; DICKSON, D.W.; HEWLETT, T.E.; ZUCKERMAN, B.M. Effects of monoclonal antibodies, cationized ferritin, and other organic molecules on adhesion of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.29, n.4, p.556-564, Dec. 1997.
- FERRIS, H.; MCKENRY, M.V. Seasonal fluctuations in the spatial distribution of nematode populations in a California vineyard. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.6, n.4, p.203-214, Dec. 1974.
- FREITAS, L.G.; MITCHELL, D.J.; DICKSON, D.W. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.29, n.4, p.547-555, Dec. 1997.

GIANNAKOU, I.O.; PEMBROKE, B.; GOWEN, S.R.; DAVIES, K.G. Effects of long term storage and above normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, Leiden, v.43, n.2, p.185-192, Mar. 1997.

GIANNAKOU, I.O.; PEMBROKE, B.; GOWEN, S.R.; DOULOUMPAKA, S. Effects of fluctuating temperatures and different host plants on development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.31, n.3, p.312-318, Sept. 1999.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1992. 342p.

HATZ, B.; DICKSON, D.W. Effect of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.24, n.4, p.512-521, Dec. 1992.

HUANG, S.P.; SOUZA, P.E.; CAMPOS, V.P. Seasonal variation of a *Meloidogyne exigua* population in a coffee plantation. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.16, n.1, p.115-117, Mar. 1984.

HUSSEY, R.S.; JANSMA, P. Immunogold localization of collagen in the cuticle of different life stages of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.20, n.4, p.641, Oct. 1988.

LORDELLO, L.G.E. Nota sobre um parasito de nematóide. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v.41, n.2, p.66-69, Jun. 1966.

LORDELLO, L.G.E. *Xiphinema campinense*, nova espécie (Nematoda, Dorylaimidae). *Bragantia*, Campinas, v.11, n.10-12, p.314316, Out./Dez. 1951.

- MANKAU, R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.26, n.3, p.333-339, Nov. 1975.
- MANKAU, R.; IMBRIANI, J.L. The life cycle of an endoparasite in some Tylenchid nematodes. **Nematologica**, Leiden, v.21, n.1, p.89-94, Jan. 1975.
- MANKAU, R.; PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.9, n.1, p.40-45, Mar. 1977.
- MATEILLE, T.; DUPONNOIS, R.; DABIRÉ, K.; N'DIAYE, S.; DIOP, M.T. Influence of the soil on the transport of the spores of *Pasteuria penetrans*, parasite of nematodes of the genus *Meloidogyne*. **European Journal of Soil Biology**, Elsevier, v.32, n.2, p.81-88, 1996.
- MATEILLE, T.; DUPONNOIS, R.; DIOP, M.T. Influence des facteurs telluriques abiotiques et de la plante hôte sur l'infection des nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne* par l'actinomyète parasitoïde *Pasteuria penetrans*. **Agronomie**, Elsevier, v.15, p.581-591, 1995.
- MELKI, K.C.; GIANNAKOU, I.O.; PEMBROKE, B.; GOWEN, S.R. The cumulative build-up of *Pasteuria penetrans* spores in root-knot nematode infested soil and the effect of soil applied fungicides on its infectivity. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge Cedex, v.21, n.6, p.679-683, 1998.
- MIRANDA, T.R.; MARBÁN-MENDOZA, N. *Pasteuria penetrans*: adherencia y parasitismo en *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabicida*. **Nematropica**, Quincy, v.29, n.2, p.233-240, Dec. 1999.
- MOAT, A.G. **Microbial physiology**. New York: John Wiley & Sons Press, 1979. 600p.

O'BRIEN, P.C. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.12, n.4, p.234, Oct. 1980.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. From the Southeastern United States. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.22, n.4, p.525-531, Oct. 1990.

ORUI, Y. Effect of spore sonication on attachment and host-attachment range of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.32, n.1, p.101-107, 1997.

PERSIDIS, A.; LAY, J.G.; MANOUSIS, T.; BISHOP, A.H.; ELLAR, D.J. Characterization of potential adhesions of the bacterium *Pasteuria penetrans*, and of putative receptors on the cuticle of *Meloidogyne incognita*, a nematode host. **Journal of Cell Science**, London, v.100, n.4, p.613-622, Dec. 1991.

RAO, M.S.; GOWEN, S.R.; PEMBROKE, B.; REDDY, P.P. Relationship of *Pasteuria penetrans* spore encumbrance on juveniles of *Meloidogyne incognita* and their infection in adults. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.25, n.1, p.129-131, June 1997.

RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R. Spore attachment of *Pasteuria penetrans* on juveniles of *Meloidogyne incognita* as affected by pH and organic matter. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.24, n.2, p.283-285, Dec. 1996.

RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R.; HAGUE, N.G.M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.19, n.2, p.225-227, Dec. 1991.

REDDIGARI, S.R.; JANSMA, P.L.; PREMACHANDRAN, D.; HUSSEY, R.S. Cuticular collagenous proteins of second-stage juveniles and adult females of *Meloidogyne incognita*: isolation and partial characterization, **Journal of Nematology**, Lakeland, v.18, n.3, p.294-302, Sept. 1986.

- SAYRE, R.M. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.12, n.4, p.260-270, 1980.
- SAYRE, R.M.; STARR, M.P. Genus *Pasteuria* Metchnikoff, 1888. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. v.2, p.2601-2615.
- SAYRE, R.M.; STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. ver., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v.52, n.2, p.149-165, 1985.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, Washington D C, v. 129, n.2, p.1091-1101, Feb. 1977.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P.; SCHMIDT, J.M.; STARR, M.P. *Pasteuria nishizawae* sp. nov., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. **Research on Microbiology**, Paris, v.142, p.551-564, 1991.
- SERRACIN, M.; SCHUERGER, A.C.; DICKSON, D.W.; WEINGARTNER, D.P. Temperature-dependent development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.29, n.2, p.228-238, July 1997.
- SHARMA, R.D.; LORDELLO, R.R.A. Occurrence of *Pasteuria penetrans* in coffee plantations infested by *Meloidogyne exigua* in the state of São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 25., 1992. Gramado. **Resumos...** Gramado: SBF, 1992. p.183.
- SLANA, L.J.; SAYRE, R.M. Some physical factors influencing spore attachment of *Bacillus penetrans* to larvae of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.14, n.4, p.471, Oct. 1982.

SOUZA, J.T. de. **Epidemiologia, Infectividade e Parasitismo de *Pasteuria* spp. em Fitonematóides**. Lavras: UFLA, 1997. 123p. (Dissertação-Mestrado em Agronomia, Fitopatologia)

SOUZA, J.T.; CAMPOS, V.P. Efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria penetrans* sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.93-102, 1997.

SOUZA, J.T.; CAMPOS, V.P. Flutuação populacional de fitonematoides associados a *Pasteuria* spp. em duas áreas naturalmente infestadas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2, p.339-344, Abr./Jun. 1999.

SOUZA, J.T.; SOUZA, R.M.; CAMPOS, V.P. Ocorrência e flutuação populacional de *Pasteuria* spp. em Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.20, n.2, p.41-51, 1996.

SPAULL, V.W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v.7, n.3, p.277-282, 1984.

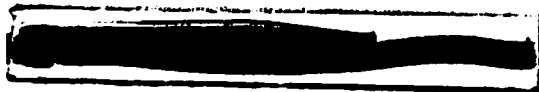
SPIEGEL, Y.; McCLURE, M.A. The surface coat of plant parasitic nematodes: chemical composition, origin, and biological role – A review. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.27, n.2, p.127-134, July 1995.

SPIEGEL, Y.; MOR, M.; SHARON, E. Attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to the surface of *Meloidogyne javanica* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.28, n.3, p.328-334, Sept. 1996.

STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.1, p.55-60, Jan. 1984.

STIRLING, G.R. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.27, n.4, p.458-462, Oct. 1981.

- STIRLING, G.R. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. *Nematologica*, Leiden, v.31, n.2, p.203-209, Apr. 1985.
- STIRLING, G.R.; BIRD, A.F.; CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue of Nematologie*, Montrouge Cedex, v.9, n.3, p.251-260, 1986.
- STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução de João Paulo de Campos et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 1089 p. Tradução de: Biochemistry.
- THORNE, G. *Duboscqia penetrans*, n. sp. (*Sporozoa*, *Microsporidia*, *Nosematidae*), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (deMan) Filipjev. *Proceedings of the Helminthological Society*, Washington, v.7, n.1, p.51-53, 1940.
- VAN GUNDY, S.D. Ecology of *Meloidogyne* spp. – emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. North Carolina: North Carolina State University Graphics, 1985. cap.15, p. 177-182.
- VERDEJO-LUCAS, S. Seasonal population fluctuations of *Meloidogyne* spp. and the *Paateuria penetrans* group in kiwi orchards. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, n.12, p.1275-1279, Dec. 1992.



CAPÍTULO 2

Efeito do pH na adesão de endósporos de *Pasteuria Penetrans* em juvenis de *Meloidogyne Javanica*.

1 RESUMO

MAXIMINIANO, C. Efeito do pH na adesão de endósporos de *Pasteuria Penetrans* em juvenis de *Meloidogyne Javanica*. In: Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.33-46. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica* foram submetidos à adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*, isolado PP1, originário da região de Lavras, MG, sob borbulhamento em tubos de vidro contendo solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M em níveis de pH 2,5; 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5, em concentrações de endósporos 10⁴ e 10⁵ nos períodos de borbulhamento 12 e 24 horas. A densidade de endósporos nos J₂ aumentou sempre no intervalo de pH 2,5 a 6,5 ($P \leq 0,01$), tendendo a se estabilizar entre os níveis 5,5 e 6,5. *Maior adesão de endósporos em J₂ ocorreu no período de 24 horas de borbulhamento e na concentração de 10⁵ endósporos/mL.

* O pH também afetou a adesão de endósporos a cutícula de juvenis, sendo esta também a faixa de > adesão.

Último parágrafo pag 43

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

MAXIMINIANO, C. Effect of pH on endospore attachment of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne javanica* juveniles. In: Factors involved on adhesion and infectivity of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.33-46. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* isolate PP1, from Lavras, MG, on second stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne javanica* were tested by air flushing into glass tube filled with sodium phosphate buffer 0.05 M, in pHs of 2.5; 3.5; 4.5; 5.5 and 6.5. Two endospore concentrations of 10⁴ and 10⁵ were studied besides two periods of air flushing, 12 and 24 hours. The spore density increased, always, on pH interval of 2.5 to 6.5, with a trend of stabilization in pH 5.5 to 6.5. Twenty-four hours was the best air flushing period for attachment and 10⁵/mL was the best endospore concentration.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A adesão do endósporo da bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr à cutícula do nematóide constitui o primeiro evento que leva ao parasitismo desse hospedeiro, quando em associações compatíveis entre *Pasteuria penetrans* e o nematóide, caracterizando a especificidade do isolado bacteriano à população do hospedeiro. Essa especificidade está ligada à natureza da cutícula do juvenil de segundo estágio de espécies de *Meloidogyne* Goeldi, 1887 em interação com o endósporo da *Pasteuria penetrans* (Davies e Danks, 1993).

O entendimento do processo de adesão de endósporos a nematóides poderá auxiliar na manipulação desse organismo como agente do controle biológico de fitonematóides. Contudo, a natureza desse mecanismo de adesão ainda não está completamente esclarecida. O'Brien (1980) pela primeira vez verificou que a adesão do endósporo não era afetada pelo pH no intervalo de 4,5 a 8,5. Entretanto, Davies, Kerry e Flynn (1988), Ratnasoma e Gowen (1996) e Orui (1997) encontraram como pH ótimo para a adesão de endósporos em J2 os níveis de 7, acima de 4, e 8, respectivamente.

Afolabi, Davies e O'Shea (1995) constataram a existência de uma maior rede de carga negativa na superfície do endósporo com pH neutro, conseqüentemente maior potencial eletrostático nesse pH e redução das cargas negativas quando o pH se afastava do neutro. Slana e Sayre (1982) estudaram a influência de alguns fatores físicos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, e concluíram que o borbulhamento através de injeção de ar proporcionou a maior taxa de adesão. O efeito da concentração de endósporos e o tempo de exposição de juvenis e endósporos de *Pasteuria penetrans* foram estudados para *Meloidogyne incognita*, em um incubador

“shaker” rotatório, e maior adesão ocorreu na concentração de 10^5 endósporos/mL após 24 horas, ou em 10^6 endósporos/mL após 12 horas (Davies, Kerry e Flynn, 1988). O borbulhamento da suspensão de endósporos e juvenis evita o efeito de outra variável no processo de adesão de endósporos em nematóides que é a movimentação desse hospedeiro na direção do endósporo, fazendo com que a adesão seja apenas o resultado da interação do endósporo e do hospedeiro, como comentado anteriormente. Desta forma, objetivou-se, nesse trabalho, definir melhor os valores de pH para o processo de adesão de endósporos em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, bem como as melhores concentrações de endósporos e tempo de exposição durante o borbulhamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos endósporos

Os endósporos foram obtidos de tomateiros infestados por *M. javanica*, cultivados em vasos de cerâmica de 12 litros, mantidos em casa de vegetação. Empregou-se o isolado PP1-UFLA, caracterizado como aderente e infectivo em *M. javanica* e *M. incognita*, conforme constataram Souza e Campos (1997). As raízes de tomateiro foram separadas cuidadosamente do solo, lavadas em água corrente e cortadas em pedaços de 1 cm. Delas, quarenta gramas foram embebidos por vinte e quatro horas em 100 mL da solução enzimática, composta de pectinase-SIGMA P-9179 e celulase-SIGMA C-1184, na concentração de 4 mL e 4 g, respectivamente, por 100 mL de solução. A seguir, as raízes foram trituradas em liquidificador por quarenta segundos e vertidas em peneira de abertura das malhas de 0,84 mm sobre peneira de 0,25 mm, coletando-se o material retido na peneira de 0,25 mm em um bequer de 200 mL, de onde fêmeas de *M. javanica* foram retiradas e colocadas em um tubo de ensaio contendo solução-tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. As fêmeas foram, então, esmagadas em triturador de tecidos. Esse material foi peneirado para retirada de restos de fêmeas e/ou ovos, obtendo-se uma suspensão límpida de endósporos, que foi quantificada através do hemacitômetro, preparando-se, assim, duas concentrações: 10^5 e 10^6 endósporos/mL.

4.2 Obtenção dos juvenis do segundo estágio (j₂) de *Meloidogyne javanica*

Raízes de tomateiro cultivado em casa de vegetação e infestadas com *M. javanica* foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1 cm. A seguir foram batidas em liquidificador por 45 segundos, em solução de

hipoclorito de sódio a 0,5 %, e vertidas em peneiras de abertura de 0,075 mm sobre 0,037 mm. O material retido na peneira de 0,037 mm foi coletado em copo e os ovos foram colocados em câmara de eclosão para a obtenção de juvenis do segundo estágio (J₂), à temperatura ambiente.

4.3 Preparo das soluções-tampões de fosfato de sódio

Foram preparadas soluções estoques A e B de Na₂ H PO₄ e Na H₂ PO₄ a 0,2 M, respectivamente. A seguir, combinando-se as soluções A e B nas proporções adequadas e fazendo-se os ajustes através de um pHmetro, foram preparadas cinco soluções com concentração de 0,05 M e pH ajustado para 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 e 6,5, que constituíram os tratamentos.

4.4 Montagem e avaliação do ensaio

Os J₂ provenientes da câmara de eclosão e recolhidos no terceiro dia, foram quantificados em microscópio de objetivas invertidas e separados em cinco porções. A seguir, foram vertidos, separadamente, sobre peneira de abertura de 0,037 mm e recolhidos através de pisseta contendo soluções-tampão de fosfato de sódio correspondentes aos diferentes níveis de pH testados. Os juvenis foram quantificados e separados 50 deles com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL, para constituir cada parcela.

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 5 x 2 x 2, para 5 níveis de pH, 2 concentrações de endósporos e 2 tempos de borbulhamento, respectivamente, em 5 repetições, totalizando 100 parcelas. O ensaio foi montado em tubos de vidro de 145 mm de altura por 14 mm de diâmetro, colocando-se, em cada tubo, 10 mL de solução-tampão correspondente ao tratamento, acrescidos de 1 mL contendo 50 juvenis de *Meloidogyne javanica*

e 1 mL de suspensão de endósporos de *Pasteuria penetrans*, isolado PP1, ajustando-se no final para 10^4 /mL e 10^5 /mL. Em cada tubo foi colocada uma mangueira de plástico ligada a bombas de ar de aquário ajustadas para borbulhamento constante e de intensidade regular entre os tubos ou parcelas pelos períodos de 12 e 24 hs. Ao final desse tempo, o conteúdo de cada tubo foi derramado em peneira de 0,037 mm e lavado em água corrente para a retirada dos endósporos não aderidos. Para a quantificação dos endósporos aderidos, os juvenis em número de 10 a 20 ao acaso, foram observados em microscópio invertido, obtendo-se, assim, o número médio de endósporos aderidos por juvenil. Os dados foram submetidos à análise de variância para esquema fatorial após transformação para $\log_e (X + 10)$, e o fator pH foi desdobrado para estudo das regressões linear e quadrática.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número médio de endósporos aderidos aos juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica* aumentou sempre no intervalo de pH 2,5 a 6,5, tendendo a se estabilizar entre os níveis de pH 5,5 e 6,5 (Figura 1), o que indica que o maior potencial eletrostático entre o endósporo e a superfície do juvenil ocorreu nesse intervalo (pH 5,5 a 6,5). As forças de ligação entre as superfícies do endósporo e da cutícula do nematóide crescem com o aumento do pH, podendo atingir o ponto máximo num nível de pH acima do limite testado.

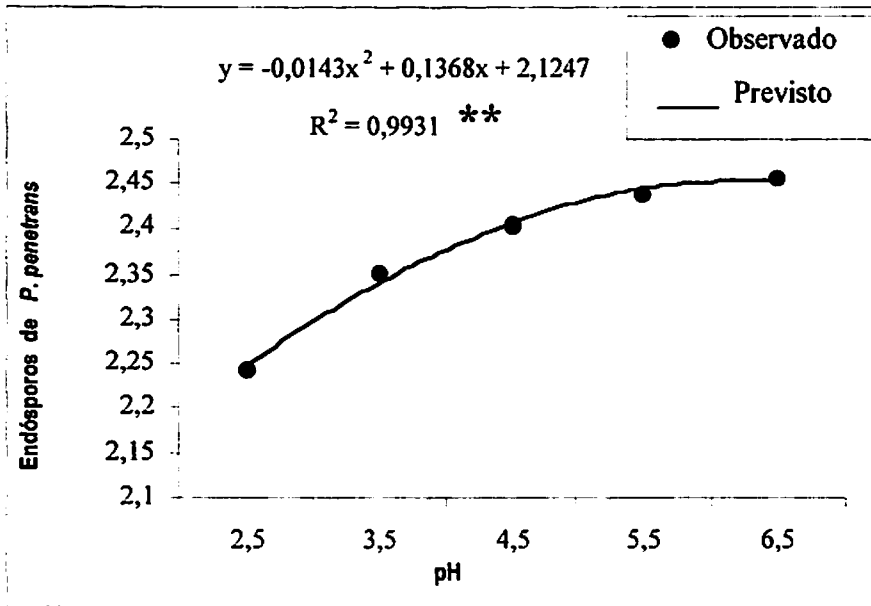


FIGURA 1- Número de endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos por J₂ de *Meloidogyne javanica* segundo o pH da suspensão (média de 12 e 24 horas de borbulhamento e das concentrações de 10⁴ e 10⁵/mL).

Ratnasoma e Gowen (1996) encontraram que o pH ótimo para a adesão de endósporos em J₂ de *Meloigogyne incognita* foi acima de 4,0. Já Orui (1997) encontrou o pH 8,0 como ótimo nesse processo, e Davies, Kerry e Flynn (1988) encontraram maior adesão dos endósporos aos J₂ em pH 7,0.

Maior adesão ($P \leq 0,05$) de endósporos de *Pasteuria penetrans* ocorreu quando se utilizou borbulhamento de ar por 24 horas, comparado com aquele de 12 horas, o que demonstra maior chance de encontro entre os J₂ e os endósporos de *Pasteuria penetrans* (Tabela 1). Davies, Kerry e Flynn (1988) também encontraram maior adesão no tempo de 24 horas, para a concentração de 10^5 endósporos/ml, e também verificaram que a densidade de endósporos nos juvenis aumentou proporcionalmente com o tempo de borbulhamento.

TABELA 1- Adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloigogyne javanica*; A) Efeito do tempo de borbulhamento em horas (hs), B) Efeito da concentração de endósporos.

Fator	Tratamento	Número de endósporos/ J ₂
A- Tempo de borbulhamento (hs)	12 hs	0,93 b
	24 hs	1,71 a
B- Concentração de endósporos	10^4	1,12 b
	10^5	1,51 a

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A exposição de juvenis a endósporos de *Pasteuria penetrans*, sob agitação, evita a aglomeração de juvenis por causa da adesão de um mesmo endósporo a mais de um juvenil (Stirling, Bird e Cakurs, 1986)

Maior adesão ($P \leq 0,05$) de endósporos de *Pasteuria penetrans* também ocorreu quando a concentração de endósporos foi de 10^5 /mL comparado com aquela de 10^4 /mL, demonstrando também maior chance de encontro dos endósporos aos J2, devido à maior concentração de endósporos (Tabela 1). Stirling, Sharma e Perry (1990) também obtiveram um aumento linear na densidade de endósporos nos juvenis com o aumento da concentração, para os quais a maior adesão ocorreu na concentração de 10^5 endósporos/mL.

6 CONCLUSÕES

- 1- O pH *in vitro* afetou a adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*, sendo a melhor faixa de pH entre 5,5 e 6,5.
- 2- A concentração de endósporos *in vitro* e o período de borbulhamento de ar em tubos de ensaio contendo suspensões de endósporos e J₂ de *Meloidogyne javanica*, também afetaram a adesão de endósporos aos juvenis do segundo estágio (J₂).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFOLABI, P.; DAVIES, K.G.; O'SHEA, P. S. The eletrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.244-249, Mar. 1995.
- DAVIES, K.G.; DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.39, p.53-64, Jan. 1993.
- DAVIES, K.G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals Applied Biology**, Warwickshire, v.112, n.3, p.491-501, June 1988.
- O'BRIEN, P.C. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.12, n.4, p.234, Oct. 1980.
- ORUI, Y. Effect of spore sonication on attachment and host-attachment range of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode. **Applied Entomology and Zoology**, Tokio, v.32, n.1, p.101-107, 1997.
- RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R. Spore attachment of *Pasteuria penetrans* on juveniles of *Meloidogyne incognita* as affected by pH and organic matter. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.24, n.2, p.283-285, Dec. 1996.
- SLANA, L.J.; SAYRE, R.M. Some physical factors influencing spore attachment of *Bacillus penetrans* to larvae of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.14, n.4, p.471, Oct. 1982.
- SOUZA, J.T. de.; CAMPOS, V.P. Efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria penetrans* sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.93-102, 1997.

STIRLING, G.R.; BIRD, A.F.; CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie*, Montrouge Cedex, v.9, n.3, p.251-260, 1986.

STIRLING, G.R.; SHARMA, R.D.; PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. *Nematologica*, Leiden, v.36, p.246-252, 1990.

CAPÍTULO 3

Efeitos de enzimas na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*

1 RESUMO

MAXIMINIANO, C. Efeitos de enzimas na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. In: Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.47-64. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Paix 50

Endósporos de *Pasteuria penetrans* foram incubados juntamente com juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica* em soluções de pectinase ou celulase, nas concentrações de 0,1 ou 1%. Variou-se o tempo de incubação dos endósporos por 12 ou 18 horas nas mesmas soluções e concentrações ou então foram pré incubados por 6 horas e lavados, sendo em seguida, aquecidos ou não a 55 °C, resfriados e submetidos a borbulhamento com ar em tubos de ensaio contendo água destilada, juntamente com J₂ de *Meloidogyne javanica*. Em 3 ensaios, verificou-se que a pectinase reduziu a adesividade dos endósporos, enquanto a celulase não teve efeito sobre a adesão. O tempo de incubação ou as concentrações da pectinase foram indiferentes para a adesão de endósporos em J₂, porém a enzima teve efeito nos endósporos e nos J₂, sendo mais intenso quando ocorreu em ambos simultaneamente.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

MAXIMINIANO, C. Enzyme effect on endospore attachment of *Pasteuria penetrans*. In: Factors involved on adhesion and infectivity of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.47-64. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Endospores of *Pasteuria penetrans* were incubated in pectinase or cellulase enzyme solutions at concentrations of 0.1 or 1%, for periods of 12 or 18 hours. Some were previously incubated in the same enzyme for 6 hours, washed and then heated or not at 55 °C. Endospores were then placed in glass tubes with distilled water and second stage juveniles (J₂), followed by air flushing. In three assays, pectinase, but not cellulase, reduced adhesion of endospore to J₂. Incubation periods and pectinase concentrations tested had no effect on adhesion process. However, pectinase affected endospores and J₂, even greater when endospores and J₂ were treated simultaneously.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Pasteuria* são gram positivas e formam endósporos no interior do corpo do hospedeiro. A continuidade do ciclo depende da adesão desses endósporos noutra hospedeiro como o primeiro evento para o estabelecimento do parasitismo. Essa adesão é específica a determinados grupos de hospedeiros. Entretanto, significa apenas uma preferência de hospedeiros, já que a especificidade deveria ser baseada no parasitismo, uma vez que a germinação do endósporo pode não ocorrer (Chen e Dickson, 1998). A natureza da adesão de endósporos à cutícula de juvenis do segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne* sp. ainda não está elucidada. No entanto, tem sido demonstrado o envolvimento de carboidratos e proteínas nesse mecanismo (Davies e Danks, 1993; Spiegel, Mor e Sharon, 1996). Sabe-se que a epicutícula dos nematóides contém como componentes diversas proteínas, lipídeos e carboidratos (Spiegel e Mc Clure, 1995). Por outro lado, demonstrou-se a presença de carboidratos como o N-acetil-glucosamina e N-acetil-murâmico na superfície dos endósporos de *Pasteuria penetrans* (Davies e Danks, 1993; Persidis et al., 1991). Esses carboidratos são constituintes do peptideo-glicano, componente majoritário da parede celular de bactérias gram-positivas, e são unidos por meio de aminoácidos raros, formando dímeros, que são polimerizados através de ligações glicosídicas beta 1,4 (Moat, 1979; Romeiro, 1995). Os pré tratamentos de juvenis de *Meloidogyne* sp e endósporos de *Pasteuria penetrans* com a lectina aglutinina do germen do trigo, reduziu a adesão dos endósporos aos nematóides, implicando no envolvimento de carboidratos no processo de adesão (Spiegel, Mor e Sharon, 1996; Davies e Danks, 1993). Também, o pré tratamento de juvenis de *Meloidogyne* sp. e endósporos de *Pasteuria penetrans* com proteases reduziu a adesividade do endósporo àquele hospedeiro, sugerindo o

envolvimento de proteínas no processo de adesão (Davies e Danks, 1993). A pré incubação desses endósporos em enzimas como a muramidase, cujo substrato é o ácido N-acetil-murâmico, também reduziu a adesividade dos endósporos em juvenis de *Meloidogyne* sp. (Davies e Danks, 1993). Além disso, o desprendimento de endósporos da cutícula de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* foi obtido com o uso da pectinase, sugerindo o envolvimento de algum substrato que promove essa ligação entre o endósporo e o hospedeiro, o qual é degradado pela enzima (Ratnasoma, Gowen e Hague, 1991). Em face disso, objetivou-se, nesse trabalho, avaliar o efeito das enzimas pectinase e celulase na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis de *Meloidogyne javanica*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimento 1: efeitos da pectinase e celulase na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*

4.1.1 Obtenção dos endósporos

Os endósporos de *Pasteuria penetrans* foram obtidos de fêmeas de *Meloidogyne javanica* infectadas, que foram retiradas de raízes de tomateiros do grupo Santa Cruz, cultivados em casa de vegetação. Empregou-se o isolado PP1, originário do campus da Universidade Federal de Lavras. As raízes foram separadas do solo, lavadas em água corrente, e cortadas em pedaços de 1 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador por quarenta segundos e vertidas em peneira de abertura das malhas de 0,84 mm sobre peneira de 0,18 mm, coletando-se o material retido na peneira de 0,18 mm em um bequer de 500 mL, do qual fêmeas de *Meloidogyne javanica* foram retiradas com o auxílio de um estilete de ponta recurvada e colocadas em um tubo de ensaio contendo solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. Todas as fêmeas foram esmagadas em triturador de tecidos. Esse material foi vertido em peneira de 0,037 mm para retirada de restos de fêmeas e/ou ovos, obtendo-se uma suspensão límpida de endósporos, que foi quantificada através do hemacitômetro, ajustada para uma concentração de $1,35 \times 10^6$ endósporos/mL, e depois armazenada em câmara fria a 8°C, para posterior utilização.

4.1.2 Obtenção dos juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*

Raízes de tomateiros cultivados em casa de vegetação e infestadas com *Meloidogyne javanica* foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1-2 cm. A seguir foram trituradas em liquidificador por 45 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % e vertidas em peneiras de abertura das malhas de 0,075 mm sobre peneira 0,037 mm. O material retido na peneira de 0,037 mm foi coletado em um bequer de 500 ml e os ovos foram colocados em câmara de eclosão para a obtenção de juvenis do segundo estágio (J₂), à temperatura ambiente.

4.1.3 Montagem do ensaio

Inicialmente foram preparadas duas concentrações 1% e 0,1% de cada uma das seguintes soluções enzimáticas: pectinase-SIGMA P-9179 de *Aspergillus niger* (poligalacturonase, glicanohidrolase; 1,0 U/mg) e celulase-SIGMA C-1184 (0,45 U/mg). Os tratamentos consistiram de 2 concentrações x 2 soluções enzimáticas, mais a testemunha (água destilada), em cinco repetições, num total de 25 parcelas. Foram colocados 9 mL de cada solução ou concentração por tratamento, além da testemunha contendo água destilada, em tubos de vidro de 2,2 cm de diâmetro por 15 cm de comprimento. A seguir, foi colocado 1 mL da suspensão de endósporos, contendo no final $1,3 \times 10^5$ endósporos/mL, aproximadamente. Cerca de 500 juvenis de *Meloidogyne javanica*, concentrados em 1 mL de água destilada, foram adicionados em cada tubo, totalizando 11 mL por tubo ou parcela. Com um tubo fino de plástico, imerso em cada suspensão no tubo de ensaio e acoplado a uma bomba de aquário, deixou-se borbulhar ar por 12 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, cada tubo de ensaio foi vertido em peneira de 0,037 mm para a lavagem dos juvenis, recolhendo-os em vidros de 50 mL. A visualização e contagem dos endósporos aderidos aos juvenis foi feita em microscópio de objetivas

invertidas. Cada parcela consistiu da média obtida com a contagem dos endósporos aderidos em 20 juvenis escolhidos ao acaso. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado e os dados foram submetidos ao teste de normalidade e ao teste de Hartley (Banzatto e Kronka, 1995), no qual se verificou a homocedasticidade. Em seguida foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para a comparação das médias.

4.2 Experimento 2: efeito do pré tratamento dos endósporos e da concentração de pectinase

4.2.1 Obtenção dos endósporos e juvenis

Os endósporos e os juvenis foram obtidos conforme descrito em 4.1.1 e 4.1.2. e armazenados em câmara fria.

4.2.2 Montagem do ensaio

Foram preparadas duas concentrações da solução enzimática pectinase-SIGMA P-9179 nas concentrações de 1% e 0,1% (1 mL/100 ml e 0,1 mL/100 mL de solução). Os tratamentos consistiram de 2 concentrações da pectinase x 2 tempos de tratamento, além da testemunha contendo água destilada, em cinco repetições, num total de 25 parcelas. O tratamento de número 1 foi constituído de água destilada, como testemunha. Nos tratamentos de número 2 e 3, os endósporos foram pré tratados nas soluções enzimáticas por 6 horas, nas concentrações de 0,1% e 1%, respectivamente, e depois permaneceram nessas soluções, com a adição dos J₂, por mais 12 horas. Nos tratamentos de número 4 e 5 os endósporos foram adicionados às soluções enzimáticas de 0,1% e 1%, respectivamente, juntamente com os juvenis de *Meloidogyne javanica*, e

permaneceram por 12 horas. Para efetuar o borbulhamento de ar, foram adicionados nove mL das suspensões enzimáticas contendo endósporos na concentração de $1,35 \times 10^6$ endósporos/mL, e mais 1 mL de água contendo 500 juvenis de *Meloidogyne javanica* em tubos de ensaio de 2,2 cm de diâmetro por 15 cm de comprimento. Um tubo fino de plástico, imerso em cada suspensão no tubo de ensaio, e acoplado a uma bomba de aquário, borbulhou ar por 12 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, cada tubo de ensaio foi vertido em peneira de 0,037 mm para a lavagem dos juvenis, recolhendo-os em vidros de 50 ml. A visualização e contagem dos endósporos aderidos aos juvenis foi feita em microscópio de objetivas invertidas. Cada parcela consistiu da média obtida com a contagem em 20 juvenis escolhidos ao acaso. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado e os dados foram submetidos ao teste de normalidade e ao teste de Hartley (Banzatto e Kronka, 1995), no qual se verificou a homocedasticidade. Em seguida foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para a comparação das médias.

4.3 Experimento 3: efeito do tratamento de endósporos com pectinase e calor

4.3.1 Obtenção dos endósporos e juvenis

Os endósporos e os juvenis foram obtidos conforme descrito em 4.1.1 e 4.1.2. A suspensão de endósporos foi concentrada em tubos de ensaio através de centrifugação, a 3000 rpm, por 10 minutos.

4.3.2 Montagem do ensaio

Utilizou-se pectinase na concentração de 1% e estabeleceram-se 5

tratamentos. No tratamento 1 (testemunha), usaram-se nove ml de água destilada mais 2 mL da suspensão de endósporos na concentração de 2×10^6 endósporos/mL, mais 1 mL da suspensão de juvenis de *Meloidogyne javanica* na concentração de 500 juvenis/mL. No tratamento 2, utilizaram-se dois mL da suspensão de endósporos em água, na concentração de 2×10^6 endósporos/mL, os quais foram tratados com calor a 55°C por 10 minutos, através da imersão do tubo de ensaio em banho maria, e em seguida resfriados e adicionado um mL da suspensão de juvenis, na concentração de 500 juvenis/mL, acrescida de 8 mL de água destilada. No tratamento 3, empregaram-se dois mL da suspensão de endósporos na concentração de 2×10^6 /mL, os quais foram adicionados a 8 mL de pectinase a 1%, para pré tratamento, durante 6 horas, e em seguida, foram filtrados através de seringa de vidro acoplada com unidade filtrante em membrana Glass de 2μ de poro, e 28 mm de diâmetro no corpo. Para restabelecer a suspensão dos endósporos na seringa, 2 mL de água destilada foram succionados, e colocados em tubos de ensaio de 1,2 cm de diâmetro por 15 cm de comprimento, nos quais os endósporos foram tratados com calor a 55°C , por 10 minutos, através da imersão dos tubos em banho maria, e resfriamento imediato. Um mL da suspensão de 500 juvenis foi acrescido aos endósporos, tratados pelo calor, juntamente com oito mL de água destilada. No tratamento 4, os endósporos, na concentração de 2×10^6 endósporos/mL, foram pré tratados e filtrados conforme descrito no tratamento 3, porém sem o tratamento com calor. Após a sucção de 2 mL de água destilada, os endósporos foram adicionados, juntamente com 1 mL da suspensão de juvenis na concentração de 500 juvenis/ml, em oito mL de água destilada. No tratamento 5, os endósporos foram pré tratados em dez mL da solução de pectinase a 1%, durante 6 horas. Logo após, foi adicionado um mL da suspensão de juvenis na concentração de 500 juvenis/mL, onde permaneceram por mais 12 horas, durante o borbulhamento de ar, totalizando 18 horas em pectinase, sem o

tratamento com calor. Um tubo fino de plástico, imerso em cada parcela e acoplado a uma bomba de aquário, borbulhou ar por 12 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, cada tubo foi vertido em peneira de 0,037 mm para a lavagem dos juvenis, recolhendo-os em vidros de 50 mL. A visualização e contagem dos endósporos aderidos aos juvenis foi feita em microscópio invertido. Cada parcela consistiu da média obtida com a contagem em 20 juvenis escolhidos ao acaso. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado e os dados foram submetidos ao teste de normalidade e ao teste de Hartley (Banzatto e Kronka, 1995), no qual se verificou a homocedasticidade. Em seguida foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para a comparação das médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1: efeitos da pectinase e celulase na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*.

A pectinase, nas duas concentrações testadas, reduziu ($P \leq 0,05$) a adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*, comparado com a testemunha, o que não aconteceu com a celulase em nenhuma concentração (Tabela 1), sugerindo que algum substrato promotor da ligação do endósporo a esse hospedeiro foi degradado pela pectinase, mas não pela celulase.

TABELA 1- Efeito de enzimas na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	Endósporos/J ₂
1- Testemunha	21,2 a
2- Celulase 0,1%	20,6 ab
3- Celulase 1%	20,0 ab
4- Pectinase 0,1%	14,5 b
5- Pectinase 1%	5,3 c
Média Geral	16,3

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Ratnasoma, Gowen e Hague (1991) também verificaram o efeito da pectinase no desprendimento de endósporos de *Pasteuria penetrans* da cutícula de juvenis de *Meloidogyne javanica*, submetidos à solução enzimática em placas de Petri. O efeito do tempo de exposição dos endósporos à pectinase não pôde ser explicado por esse ensaio, já que os endósporos e os J₂ foram incubados pelo mesmo período de tempo. Daí idealizou-se outro experimento (Experimento 2).

5.2 Experimento 2: efeito do pré-tratamento dos endósporos e da concentração de pectinase

Endósporos de *Pasteuria penetrans*, pré tratados com pectinase 0,1% ou 1% e/ou incubados com juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica* na presença dessas mesmas concentrações, tiveram reduções semelhantes na adesão, quando comparados com a testemunha (Tabela 2). Isso sugere que a

TABELA 2- Efeito do pré-tratamento de endósporos e da concentração de pectinase na adesão de *Pasteuria penetrans* à cutícula de J₂ de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	Endósporos/J ₂
1- Testemunha (água destilada)	22,5 a
2- Pectinase 0,1% (pré tratamento dos endósporos)	5,6 b
3- Pectinase 1% (pré tratamento dos endósporos)	4,7 b
4- Pectinase 0,1% (incubação conjunta)	5,3 b
5- Pectinase 1% (incubação conjunta)	5,4 b
Média Geral	8,7

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

pectinase tem efeito sobre o endósporo, antes ou no momento do contato com o J2. O aumento do tempo de exposição dos endósporos à pectinase, de 12 horas para 18, não alterou o efeito da adesividade aos J2. Por outro lado, a pectinase pode ter tido efeito sobre a cutícula do J2. Além disso, o efeito da temperatura alta no endósporo poderia afetar a adesão. Daí idealizou-se outro experimento (Experimento 3).

5.3 Experimento 3: efeito do tratamento de endósporos com pectinase e calor

A adesão dos endósporos de *Pasteuria penetrans* aquecidos a 55 °C, em juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, não diferiu ($P \leq 0,05$) da testemunha (Tabela 3). Porém quando os endósporos foram pré tratados com pectinase 1%, indiferente do aquecimento, a adesão desses endósporos aos J2 diferiu da testemunha, demonstrando que o efeito da pectinase no endósporo é mais relevante do que o aquecimento. Desta forma, parece que no processo de adesão não estão envolvidas proteínas da estrutura do endósporo, mas sim carboidratos. O pré tratamento dos endósporos em pectinase 1%, seguido da incubação conjunta aos J2 nessa solução enzimática, reduziu significativamente o processo de adesão, demonstrando, que o efeito dessa enzima sobre o endósporo pode ter sido devido ao maior tempo (18 horas) de exposição (Tabela 3). Entretanto a inibição completa da adesão não foi atingida. Diante disso, verificou-se que pelo menos dois mecanismos ou pares de substâncias aderentes estão envolvidas no processo de adesão entre os endósporos e a cutícula dos J2. Davies e Danks (1993) também verificaram que a pré incubação de J2 ou endósporos em enzimas glicolíticas, como a muramidase ou quitinase, reduziu a adesão dos endósporos aos J2 de *Meloidogyne incognita*, demonstrando que carboidratos na superfície da cutícula do J2 ou do endósporo podem estar

envolvidos no processo de adesão. Segundo Davies, Afolabi e O'Shea (1996), a ausência da completa inibição da adesão de endósporos a nematóides sugere o envolvimento de mais de um mecanismo ou processo de adesão entre *Pasteuria* spp. e nematóides.

TABELA 3- Efeito do pré tratamento com pectinase e tratamento térmico de endósporos na adesão de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	Endósporos/J ₂
1- Testemunha (água destilada)	17,1 a
2- Aquecimento (sem pré tratamento com pectinase 1%)	15,4 ab
3- Pectinase 1% (pré tratamento mais aquecimento)	14,3 b
4- Pectinase 1% (pré tratamento sem aquecimento)	14,0 b
5- Pectinase 1% (pré trat. + 12 hs junto com J ₂ + pectinase)	6,4 c
Média Geral	13,5

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

6 CONCLUSÕES

- 1- A pectinase-SIGMA P-9179 *in vitro* foi capaz de reduzir a adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.
- 2- O aquecimento de endósporos de *Pasteuria penetrans* a 55 °C, por 10 minutos, não foi capaz de reduzir a adesão desses endósporos aos J2 de *Meloidogyne javanica*.
- 3- A celulase não foi capaz de reduzir *in vitro* a adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula de J2 de *Meloidogyne javanica*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: Funep, 1995. 247 p.
- CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.30, n.3, p.313-340, Sept. 1998.
- DAVIES, K.G.; AFOLABI, P.; O'SHEA, P. Adhesion of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) inhibited by fibronectin: a study of electrostatic and hydrophobic interactions. **Parasitology**, Cambridge, v.112, p.553-559, 1996.
- DAVIES, K.G.; DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.39, n.1, p. 53-64, Jan. 1993.
- MOAT, A.G. **Microbial physiology**, New York: John Wiley and Sons Press, 1979. 600p.
- PERSIDIS, A.; LAY, J.G.; MANOUSIS, T.; BISHOP, A.H.; ELLAR, D.J. Characterization of potential adhesions of the bacterium *Pasteuria penetrans*, and of putative receptors on the cuticle of *Meloidogyne incognita*, a nematode host. **Journal of Cell Science**, London, v.100, n.4, p.613-622, Dec. 1991.
- RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R.; HAGUE, N.G.M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.19, n.2, p.225-227, Dec. 1991.

ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995, 283p.

SPIEGEL, Y.; McCLURE, M.A. The surface coat of plant parasitic nematodes: chemical composition, origin, and biological role – A review. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.27, n.2, p.127-134, July 1995.

SPIEGEL, Y.; MOR, M.; SHARON, E. Attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to the surface of *Meloidogyne javanica* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.28, n.3, p.328-334, Sept. 1996.



CAPÍTULO 4

Efeito de filtrados rizobacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*



1 RESUMO

MAXIMINIANO, C. Efeito de filtrados rizobacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. In: Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.65-77. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Endósporos de *Pasteuria penetrans* foram incubados em filtrados bacterianos obtidos de colônias de rizobactérias antagônicas a *Meloidogyne* sp., e cultivadas em meio líquido, 523 de Kado e Heskett (1970). Verificou-se que os filtrados obtidos dos isolados ALF 166, ALF 132 e TOM 163 reduziram a adesão dos endósporos à cutícula dos juvenis de *Meloidogyne javanica* de forma semelhante entre si, porém com mais intensidade do que aquela induzida pelo filtrado obtido do isolado ALF 124.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

MAXIMINIANO, C. Effect of Rhizobacterium filtrates on *Pasteuria penetrans* endospores adhesion to second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne javanica*. In: Factors involved on adhesion and infectivity of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.65-77. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Endospores of *Pasteuria penetrans* were incubated in rhizobacterium filtrates produced by 523 Kado and Heskett (1970) liquid medium cultures of antagonistic rhizobacteria to *Meloidogyne* sp. previously tested. Filtrated from ALF 166, ALF 132 and TOM 163 isolates similarly reduced endospore adhesion to J₂ of *Meloidogyne javanica* compared to control, but more intensively reduced adhesion than ALF 124 isolate.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Pasteuria spp. pertencem a um grupo de bactérias que produzem endósporos, as quais são parasitas obrigatórias de nematóides e de representantes da ordem *Cladocera*, como a pulga aquática *Daphnia magna* Straus. O parasitismo de *Meloidogyne* spp. por *Pasteuria penetrans* consiste na adesão, germinação do endósporo e na infecção ocorrida no interior do hospedeiro vivo. No final do seu ciclo, o endósporo de *Pasteuria penetrans* precisa ter o invólucro da raiz e do corpo da fêmea degradados para a sua liberação no solo. Nesse estágio, outras bactérias têm sido observadas em associação ou aderidas aos endósporos de *Pasteuria penetrans* (Duponnois, Netscher e Mateille, 1997; Chen e Dickson, 1998). Entretanto, essa associação não afetou a adesão dos endósporos de *Pasteuria penetrans* aos juvenis de *Meloidogyne graminicola* (Duponnois, Netscher e Mateille, 1997). Por outro lado, em *Meloidogyne javanica*, uma grande maioria de isolados rizobacterianos obtidos de galhas de tomateiros aumentou a adesão dos endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula dos juvenis, enquanto outra maioria de isolados obtidos do solo não teve efeito na adesão (Duponnois e Ba, 1998). Noutro ensaio, com *Meloidogyne incognita*, as rizobactérias *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas mendocina* aumentaram a adesão dos endósporos de *Pasteuria penetrans* aos nematóides *in vitro* (Duponnois, Ba e Mateille, 1999). Sabe-se que na rizosfera existem populações diversificadas de bactérias e num m² de solo podem ocorrer de 30 a 300 gramas de bactérias (Metting, 1993). Nesse nicho ecológico estão também as bactérias *Pasteuria penetrans*, associando-se às demais. Entretanto, o efeito dessas associações sobre a adesividade de endósporos de *Pasteuria* spp. a nematóides ainda não está esclarecido. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, verificar o efeito de filtrados bacterianos, que foram obtidos a partir de

rizobactérias isoladas em alface e tomateiro e antagônicas ao nematóide das galhas, sobre a adesão dos endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos filtrados

Os isolados bacterianos foram obtidos da rizosfera de alface e tomateiro, previamente testados por Coimbra (1998) como antagonistas a *Meloidogyne* sp. Utilizaram-se os isolados ALF 132, ALF 124, ALF 166 e TOM 163, originários de Ijaci, MG. Para uniformização, as culturas foram repicadas para placas de Petri de 9,5 cm de diâmetro, contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970), composto de caseína hidrolisada, Mg SO₄, extrato de levedura, K₂ HPO₄ e dextrose, e incubadas a 25 °C em câmara de crescimento, B.O.D. Em seguida foram repicadas para meio líquido 523, contido em tubos de 2,2 cm de diâmetro por 15 cm de comprimento, preparados com antecedência. Após o cultivo por 7 dias, os meios foram filtrados através de seringas acopladas com unidade filtrante com membrana durapore de 0,27 µ de poro e 13 mm de corpo, obtendo-se cerca de 2 mL de cada filtrado, que em câmara de fluxo laminar, foram colocados em tubos de ensaio previamente esterilizados, e em seguida vedados com filme plástico até a adição dos endósporos.

4.2- Obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Raízes de tomateiros cultivados em casa de vegetação e infestadas com *Meloidogyne javanica* foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1-2 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador por 45 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % e vertidas em peneiras de abertura de 0,075 mm sobre 0,037 mm. O material retido na peneira de 0,037 mm foi coletado em

béquer de 500 mL e os ovos foram colocados em uma câmara de eclosão para a obtenção de juvenis do segundo estágio (J₂), à temperatura ambiente.

4.3 Obtenção dos endósporos

Endósporos de *Pasteuria penetrans*, isolado PP7, originário de Barra do Corda, PA, foram obtidos de raízes secas, através do esmagamento em almofariz com água destilada. A seguir, o material triturado foi vertido em peneiras de aberturas de malhas 0,18 mm, coletando-o em um béquer de 500 mL. Novamente foi vertido em peneira de abertura de malhas de 0,075 mm, e coletado em béquer. Finalmente foi vertido em peneira de abertura de malhas de 0,025 mm, obtendo-se a suspensão em béquer. Essa suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm, em tubos de ensaio de 2,2 cm de diâmetro por 15 cm de comprimento, retirando-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta automática. No passo seguinte, foi adicionado ao sedimento, álcool etílico P.A., na proporção de 3:1, formando uma suspensão em álcool 75%, na qual permaneceu por 24 horas. Após esse período e em câmara de fluxo laminar, a suspensão foi filtrada em seringa de vidro esterilizada e adaptada com unidade filtrante com membrana Glass, de 2 µ de poro e 28 mm de corpo, esterilizada em álcool etílico. Em seguida, após a sucção de 2 mL de água destilada e esterilizada, a suspensão foi adicionada ao filtrado bacteriano, no qual permaneceu por 48 horas. Após esse período, a suspensão foi novamente filtrada com seringa e unidade filtrante, e após sucção de 2 mL de água destilada, foi adicionada a tubos de ensaio contendo solução-tampão fosfato de sódio, pH 7,0, e juvenis de *Meloidogyne javanica*, num volume total de 10 mL. Os tratamentos consistiram de filtrados dos isolados bacterianos ALF 132, ALF 124, ALF 166 e TOM 163, além da testemunha com apenas solução-tampão fosfato de sódio, pH 7,0, em cinco repetições. Com um tubo fino de plástico, imerso em cada

suspensão, e acoplado a uma bomba de aquário, deixou-se borbulhar ar por 12 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, cada tubo de ensaio foi vertido em peneira de abertura das malhas de 0,037 mm para a lavagem dos juvenis, recolhendo-os com água destilada em vidros de 50 mL. A visualização e contagem dos endósporos aderidos aos juvenis foi feita em microscópio de objetivas invertidas. Cada parcela consistiu da média obtida da contagem dos endósporos aderidos em 20 juvenis escolhidos ao acaso. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e ao teste de Hartley (Banzatto e Kronka, 1995), no qual se verificou a homocedasticidade. Em seguida foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para a comparação das médias.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os filtrados rizobacterianos testados reduziram a adesão dos endósporos de *Pasteuria penetrans* ($P \leq 0,05$) comparados com a testemunha (tabela 1). Entretanto, aqueles obtidos dos isolados ALF 166, ALF 132 e TOM 163 tiveram efeitos semelhantes entre si, porém proporcionando maior redução na adesão ($P \leq 0,05$) do que aquela induzida pelo filtrado obtido do isolado ALF 124, demonstrando, por conseguinte, diferença, talvez na quantidade da substância que afeta a adesão, ou mesmo na presença de substâncias diferentes entre os citados isolados. As bactérias são capazes de produzir um grande número de metabólitos como antibióticos, fitohormônios e diversas enzimas que degradam os exsudatos radiculares no solo (Vancura, 1988). A adesão diferenciada entre isolados bacterianos também foi observada por Duponnois e Ba (1998), porém com o incremento da adesão em alguns isolados e em outros não. Essas substâncias que reduziram a adesão dos endósporos aos juvenis podem, talvez, agir na degradação de algum carboidrato do exosporium ou das fibras parasporais, o qual está envolvido no mecanismo de adesão dos endósporos, ou mesmo ter ações em níveis diferentes, de acordo com o tipo de cada substância que ocorra no filtrado. Um melhor conhecimento dos fatores bióticos que atuam no sistema *Pasteuria*-nematóide conduzirá a um melhor desempenho dessa bactéria como um agente de controle bioativo.

TABELA 1- Efeito de filtrados bacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	Número médio de endósporos/J ₂
Testemunha	12,94 a
ALF 124	6,07 b
ALF 166	3,64 c
ALF 132	3,33 c
TOM 163	3,31 c
Média Geral	5,86

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

6 CONCLUSÕES

- 1 Filtrados de culturas rizobacterianas *in vitro* foram capazes de reduzir a adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.
- 2 A intensidade na redução da adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a J2 de *Meloidogyne javanica* foi diferente entre filtrados de culturas rizobacterianas *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: Funep, 1995. 247 p.
- CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.30, n.3, p.313-340, Sept. 1998.
- COIMBRA, J.L. **Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* spp.** Lavras: UFLA, 1998. 76p. (Dissertação- Mestrado em Agronomia, Fitopatologia).
- DUPONNOIS, R.; BA, A.M. Influence of the microbial community of a sahel soil on the interactions between *Meloidogyne javanica* and *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.44, n.4, p.331-343, Aug. 1998.
- DUPONNOIS, R.; BA, A.M.; MATEILLE, T. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. **Nematology**, Leiden, v.1, p.95-101, 1999.
- DUPONNOIS, R.; NETSCHER, C.; MATEILLE, T. Effect of the rhizosphere microflora on *Pasteuria penetrans* parasitizing *Meloidogyne graminicola*. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.25, n.1, p.99-103, June 1997.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective medium for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St Paul, v.60, p.967-969, 1970.
- METTING Jr, F.B. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In: METTING Jr, F.B. **Soil microbial ecology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1993. pt. 1, cap.1, p.3-25.

VANCURA, V. Microorganisms, their mutual relations and functions in the rhizosphere. In: VANCURA, V.; KUNC, F. **Soil microbial associations**. Amsterdam: Elsevier, 1988. Cap.4, p.191-280.

CAPÍTULO 5

Influência das raças de *Meloidogyne incognita* na infectividade de *Pasteuria penetrans*

1 RESUMO

MAXIMINIANO, C. Influência das raças de *Meloidogyne incognita* na infectividade de *Pasteuria penetrans*. In: Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.78-90. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

raça 81

Populações de *Meloidogyne incognita*, das raças 1, 2, 3 e 4, além de *Meloidogyne javanica* foram submetidas ao teste de infectividade através do parasitismo de *Pasteuria penetrans* em fêmeas dessas populações. O ensaio foi realizado em casa-de-vegetação e a população PP12 de *Pasteuria penetrans* foi pré misturada ao solo, uniformemente nos vasos, recebendo depois o inóculo dos fitonematóides e o plantio de tomateiros. Verificou-se que a infectividade foi maior em *Meloidogyne javanica*, com 71% de fêmeas parasitadas, do que em qualquer raça de *Meloidogyne incognita*. Dentro de *Meloidogyne incognita*, a infectividade foi diferente entre as raças, tendo sido maior na raça 4, com 37% de fêmeas infectadas.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

MAXIMINIANO, C. *Meloidogyne incognita* race effect on *Pasteuria penetrans* infectivity. In: Factors involved on adhesion and infectivity of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.78-90 . (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Infectivity tests of *Pasteuria penetrans* on females of *Meloidogyne incognita* races 1, 2, 3 and 4 besides *Meloidogyne javanica* were done in greenhouse. Endospores of *Pasteuria penetrans* PP12 were uniformed mixed into potted soil followed by nematode infestation and planted with tomato. *Pasteuria penetrans* infectivity was greater in *Meloidogyne javanica* with 71% infectivity than in any race of *Meloidogyne incognita*. Infectivity of *Meloidogyne incognita* were different among races but greatest in race 4 with 37% of females infected.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Pasteuria penetrans (Thorne, 1940) Sayre e Starr 1985 é considerada um agente bioativo com grande potencial para o controle de fitonematóides. Entretanto, a sua especificidade em relação ao hospedeiro é ainda pouco compreendida e se inicia com a adesão do endósporo à cutícula do nematóide. Sabe-se que apenas 20% dos endósporos são capazes de infectar os nematóides (Stirling, 1984; Rao et al., 1997). Juvenis carregados com 3 a 5 endósporos resultaram num índice de infecção de 90% ou 40%, conforme verificaram Stirling (1984) e Rao et al. (1997), respectivamente, contrariando o esperado, de 100%, já que com 5 endósporos/juvenil todas as fêmeas estariam presumivelmente infectadas. Isto é devido, talvez, ao fato de que nem todos os juvenis carregados com endósporos seriam capazes de penetrar no sistema radicular (Rao et al., 1997), ou então pelo desprendimento dos endósporos com o movimento dos nematóides no solo (Ratnasoma, Gowen e Hague, 1991). Numa segunda etapa, o crescimento endógeno da bactéria no nematóide determina o seu parasitismo.

Sob o ponto de vista estatístico, o número de fêmeas parasitadas em relação ao seu número total determina o índice de infectividade, que por sua vez denota a especificidade real da *Pasteuria* sp., já que o caráter hospedeiro é caracterizado pelo parasitismo.

A especificidade de *Pasteuria penetrans* a populações de nematóides tem sido demonstrada através de testes de adesão e de infectividade (Mankau e Prasad, 1977; Stirling, 1985; Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1990; Davies e Danks, 1992; Souza e Campos, 1997; Miranda e Marbán-Mendoza, 1999; Carneiro et al., 1999).

Os nematóides têm ocorrido frequentemente em populações mistas, e suas cutículas têm exibido polimorfismo em relação à natureza de sua constituição, demonstrado através de perfis de eletroforese (Davies e Danks, 1992). Por outro lado, a heterogeneidade em relação aos sítios de ligações na superfície dos endósporos tem sido verificada entre populações diferentes de *Pasteuria penetrans* (Davies e Redden, 1997). A infectividade ocorreu em *Meloidogyne incognita* raça 1, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne arenaria* raça 1, com índices de 25%, 73% e 57%, respectivamente, quando se usou o isolado P-100, obtido de *Meloidogyne* sp., na Flórida (Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1990). Em *Meloidogyne arabicida* e *Meloidogyne incognita*, os índices chegaram a 32% e 45%, respectivamente (Miranda e Marbán-Mendoza, 1999).

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência das raças 1, 2, 3 e 4 de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* na infectividade de *Pasteuria penetrans*, isolado PP12, originário do município de Ijaci, MG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos endósporos

O isolado PP12, originário do município de Ijaci, MG, foi multiplicado em raízes de tomateiros cultivados com cada uma das raças 1, 2, 3 e 4 de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*, em casa de vegetação, separadamente. As raízes foram trituradas em liquidificador por 40 segundos e vertidas em peneira de abertura das malhas de 0,84 mm sobre peneira de 0,18 mm. O material retido na peneira de 0,18 mm foi recolhido em 2 erlenmeyers de volume igual a 2 litros cada um. As fêmeas contidas nesse material foram retiradas com o auxílio de um estilete de ponta recurvada e depositadas em um erlenmeyer de 500 ml, contendo solução-tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. Logo após, foram esmagadas em triturador de tecidos e vertidas em peneira 0,037 mm, obtendo-se a suspensão dos endósporos, que foi armazenada a 8°C, em câmara fria.

4.2 Obtenção dos inóculos de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*

Raízes de tomateiros cultivados em casa de vegetação e infestadas com *Meloidogyne incognita*, raças 1, 2, 3 e 4, e *Meloidogyne javanica*, foram lavadas separadamente e cortadas em pedaços de 1-2 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador por 45 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % e vertidas em peneiras de abertura de 0,075 mm sobre 0,037 mm. O material retido na peneira de 0,037 mm foi coletado em vidros de 500 mL de capacidade, separadamente, e armazenado na câmara fria para posterior utilização.

4.3 Preparo dos vasos

O substrato utilizado foi composto de solo, areia e esterco na proporção de 1:2:1, respectivamente, previamente tratado com brometo de metila e peneirado. Vinte e cinco vasos plásticos foram cheios com 2 litros do substrato tratado. A suspensão de endósporos foi distribuída de forma homogênea em volumes iguais para cada vaso contendo o substrato. Verificou-se através da quantificação em hemacitômetro, que cada cm^3 de solo recebeu o equivalente a $7,8 \times 10^4$ endósporos. A seguir, 2 mudas de tomateiro, cv. Kada, do grupo Santa Cruz, foram transplantadas para cada vaso. Os tratamentos consistiram de 4 raças de *Meloidogyne incognita*, além de *Meloidogyne javanica*, em cinco repetições, num total de 25 parcelas. Após uma semana, os vasos foram infestados com 10000 ovos/vaso das respectivas raças 1, 2, 3 e 4 de *Meloidogyne incognita* e da população de *Meloidogyne javanica*, à temperatura ambiente da casa de vegetação. A infestação foi feita através de 5 furos por vaso, realizados com bastão de vidro, a uma distância de 5-10 cm das mudas de tomateiro.

4.3- Avaliação

Após 60 dias de cultivo, as raízes foram separadas do solo, lavadas, picadas em pedaços de 1-2 cm e trituradas em liquidificador. Em seguida, o material foi vertido em peneiras de abertura das malhas de 0,84 mm sobre 0,18 mm. O material retido nas peneiras de 0,18 mm foi recolhido em vidros de 500 mL de capacidade e guardado em câmara fria para a avaliação. As fêmeas de cada parcela foram retiradas com o auxílio de um estilete de ponta recurvada, e em grupos de 5 ao acaso, foram esmagadas em lâminas de vidro contendo água destilada, sob lamínulas. A extrusão dos endósporos foi considerada como sinal

positivo de infecção, anotando-se o número de fêmeas infectadas e não infectadas num total de 20 fêmeas para cada parcela. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e ao teste de Hartley (Banzatto e Kronka, 1995), no qual se verificou a homocedasticidade. Em seguida foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para a comparação das médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infectividade do isolado PP12 de *Pasteuria penetrans* foi maior ($P \leq 0,05$) em *Meloidogyne javanica* do que em qualquer outra população de nematóides testada, chegando a 71% de fêmeas infectadas (Tabela 1). Em *Meloidogyne incognita*, a infectividade de *Pasteuria penetrans* foi maior ($P \leq 0,05$) na raça 4 do que nas raças 1 e 3 (Tabela 1). Essa infectividade em espécies e raças diferentes significa que essas populações de nematóides são geneticamente heterogêneas com respeito à susceptibilidade a *Pasteuria penetrans*. Esses resultados concordam com os obtidos por Oostendorp, Dickson e Mitchell (1990) e Miranda e Marbán-Mendoza (1999), que obtiveram índices de infectividade diferentes para espécies diferentes de *Meloidogyne*.

TABELA 1- Porcentagem de infectividade causada por *Pasteuria penetrans* em fêmeas de *Meloidogyne javanica* e de *Meloidogyne incognita* raças 1, 2, 3 e 4.

ESPÉCIE/RAÇA	INFECTIVIDADE %
<i>Meloidogyne javanica</i>	71 a
<i>Meloidogyne incognita</i> raça 4	37 b
<i>Meloidogyne incognita</i> raça 2	16 b c
<i>Meloidogyne incognita</i> raça 1	11 c
<i>Meloidogyne incognita</i> raça 3	7 c
Média Geral	28

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Multiplicações sucessivas do isolado PP12 de *Pasteuria penetrans* em populações de *Meloidogyne incognita* raça 3 podem, talvez, elevar a taxa de infectividade encontrada nesse ensaio. Multiplicações sucessivas do isolado PP3 da África do Sul, em *Meloidogyne naasi*, aumentou a infectividade em relação àquela da população inicial (Channer e Gowen, 1992).

6 CONCLUSÕES

- 1 A infectividade de *Meloidogyne* spp. por *Pasteuria penetrans* foi diferente entre *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*, sendo superior para *M. javanica*.
- 2 Dentro de *Meloidogyne incognita*, a infectividade causada por *Pasteuria penetrans* foi diferente entre as raças 1, 2, 3 e 4.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: Funep, 1995. 247 p.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; FREITAS, L.G.; DICKSON, D.W. Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematology**, Leiden, v.1, p.267-271, 1999.
- CHANNER, G. de R.; GOWEN, S.R. Selection for increased host resistance and increased pathogen specificity in the *Meloidogyne-Pasteuria penetrans* interaction. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge Cedex v.15, n.4, p.331-339, 1992.
- DAVIES, K.G.; DANKS, C. Interspecific differences in the nematode surface coat between *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* related to the adhesion of the bacterium *Pasteuria penetrans*. **Parasitology**, Cambridge, v.105, p. 75-480, 1992.
- DAVIES, K.G.; REDDEN, M. Diversity and partial characterization of putative virulence determinants in *Pasteuria penetrans*, the hyperparasitic bacterium of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Journal of Applied Microbiology**, London, v.83, n.2, p.227-235, Aug. 1997.
- MANKAU, R.; PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.9, p.40-45, 1977.
- MIRANDA, T.R.; MARBÁN-MENDOZA, N. *Pasteuria penetrans*: adherencia y parasitismo en *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabicida*. **Nematropica**, Quincy, v.29, n.2, p.233-240, Dec. 1999.
- OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. From the Southeastern United States. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.22, n.4, p.525-531, Oct. 1990.

- RAO, M.S.; GOWEN, S.R.; PEMBROKE, B.; REDDY, P.P. Relationship of *Pasteuria penetrans* spore encumberance on juveniles of *Meloidogyne incognita* and their infection in adults. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.25, n.1, p.129-131, June 1997.
- RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R.; HAGUE, N.G.M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.19, n.2, p.225-227, Dec. 1991.
- SOUZA, J.T.; CAMPOS, V.P. Efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria penetrans* sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.93-102, 1997.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.1, p.55-60, Jan. 1984.
- STIRLING, G.R. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. **Nematologica**, Leiden, v..31, n.2, p.203-209, Apr. 1985.

— **CAPÍTULO 6**

Efeito de solo argiloso e substratos orgânico e mineral na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*

1 RESUMO

MAXIMINIANO, C. Efeito de solo argiloso e substratos orgânico e mineral na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. In: Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.91-109. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Testou-se o efeito da adsorção de endósporos de *Pasteuria penetrans* em substratos como esterco, folhas moídas de crotalária, solo argiloso ou areia, sob o borbulhamento de ar em tubos de ensaio contendo solução tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, mais substrato, pelo período de 72 horas. Para a comprovação do efeito, adicionou-se a suspensão de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica* e determinou-se a adesão dos endósporos aos nematóides sob o borbulhamento de ar, por 12 horas. Verificou-se que todos os substratos testados reduziram a adesão dos endósporos aos J₂, porém o solo argiloso proporcionou uma maior redução na adesão do que a areia ou esterco curtido. Em outro ensaio, todos os substratos reduziram também a adesão dos endósporos aos J₂, porém a crotalária moída proporcionou maior redução na adesão do que o esterco e se igualou ao solo argiloso, demonstrando que os endósporos de *Pasteuria penetrans* podem ficar adsorvidos no solo ou em seus constituintes.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

MAXIMINIANO, C. **Clay soil and organics substract and mineral effects on *Pasteuria penetrans* endospore adhesion to second stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne javanica*.** In: Factors involved on adhesion and infectivity of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.91-109 . (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Adsorption of *Pasteuria penetrans* endospores to cow manure, ground leaves of *Crotalaria*, clay soil or sand were tested in glass tubes with sodium fosfate buffer 0.05 M, pH 7.0, mixed with those substrats and air flushed during 72 hours. After that, *Meloidogyne javanica* J₂ were placed into the glass tubes. Twelve hours later the number of endospores attached per J₂ were evaluated. All substrates tested reduced endospores attachment to J₂, compared to control, but endospore adhesion reduction was greater in clay soil than in sand or cow manure. In another essay, all substrates reduced endospore adhesion compared to control but clay soil and ground *crotalaria* greatly reduced adhesion compared to cow manure, demonstrating that *Pasteuria penetrans* endospores can be adsorbed to soil or organic materials.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

As espécies de *Pasteuria* têm sido encontradas em nematóides, com exceção apenas de uma espécie que foi encontrada parasitando a pulga aquática *Daphnia magna* Strauss. A *Pasteuria penetrans* é o agente de controle biológico de fitonematóides com a maior chance de sucesso até o momento. Entretanto, não se conhece ainda todo o seu potencial, devido às dificuldades existentes, como o desconhecimento de técnicas para o cultivo *in vitro*, especificidade de hospedeiros e o seu comportamento físico-químico no solo.

Sítios de ligações eletroquímicas compatíveis ocorrem em sua superfície de carga negativa possibilitando adesão a outras superfícies carregadas como as dos minerais ou da fase orgânica do solo, através de pontes ou íons disponíveis. Poucos estudos têm sido feitos em relação à influência da textura dos solos na população de *Pasteuria* spp. A disponibilidade máxima de endósporos de *Pasteuria penetrans* dependerá do equilíbrio entre textura e estrutura ótimas do solo (Mateille, Duponnois e Diop, 1995). As populações de *Meloidogyne* spp. infectadas com *Pasteuria penetrans* têm sido mais abundantes em solos arenosos do que em solos argilosos (Mateille, Duponnois e Diop, 1995). Stirling, Sharma e Perry (1990) verificaram baixas adesões dos endósporos aos nematóides em areia, na qual se movimentavam em suspensões de endósporos contendo 10^4 ou 5×10^4 endósporos/grama de areia, e sugeriram que o nível crítico para a adesão dos endósporos deveria ser de 10^5 endósporos/grama de solo. Resultados semelhantes, indicando o nível crítico de 10^5 endósporos/grama de solo, foram obtidos em solo arenoso com 87,9% de areia, 5,1% de argila, 5% de silte e 2% de matéria orgânica, nas concentrações de 3×10^4 e 10^5 endósporos/grama de solo (Adiko e Gowen, 1999). Melki et al. (1998) verificaram que ao adicionar as concentrações de 0,5; 1; 2; e 4×10^4 endósporos/

grama de solo proporcionaram, ao final do primeiro ciclo da cultura de melão, uma adesão média menor do que 1 endósporo por juvenil, em bioteste com o solo. Estudando na Flórida cinco concentrações de endósporos aplicadas, durante dois anos, em solo arenoso com a seguinte composição: 94% de areia, 1% de silte, 5% de argila e 0,1% de matéria orgânica, verificou-se que para uma concentração inicial de 10^4 endósporos/ grama de solo, e mesmo após três ciclos, os juvenis de *Meloidogyne arenaria* apresentaram baixa adesão de endósporos, com média de 2,2 endósporos/juvenil (Chen et al., 1996). Portanto, ainda existem controvérsias com relação ao parasitismo de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne*. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o comportamento de endósporos de *Pasteuria penetrans* pré misturados a substratos como esterco, folhas moídas de crotalária, solo argiloso ou areia, na adesão à cutícula de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*, sem a movimentação dos nematóides.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimento 1: efeito de substratos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*

4.1.1 Obtenção dos juvenis

Raízes de tomateiros cultivados em casa de vegetação e infestadas com *Meloidogyne javanica* foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1-2 cm. A seguir foram trituradas em liquidificador por 45 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % e vertidas em peneiras de abertura das malhas de 0,075 mm sobre peneira 0,037 mm. O material retido na peneira de 0,037 mm foi colectado em um béquer de 500 mL, com o auxílio de uma pisseta (Hussey e Barker, 1973), e os ovos foram colocados em câmara de eclosão para a obtenção de juvenis do segundo estágio (J₂), à temperatura ambiente.

4.1.2 Obtenção dos endósporos

Os endósporos de *Pasteuria penetrans* foram obtidos de fêmeas de *Meloidogyne javanica* infectadas, retiradas das raízes de tomateiros, grupo Santa Cruz, cv. Kada, cultivados em casa de vegetação. Empregou-se o isolado PP1, originário do campus da Universidade Federal de Lavras. As raízes foram lavadas em água corrente, e em seguida cortadas em pedaços de 1-2 cm. A seguir, as raízes foram trituradas em liquidificador por quarenta segundos e vertidas em peneira de abertura das malhas de 0,84 mm sobre peneira de 0,18 mm, colectando-se o material retido na peneira de 0,18 mm num béquer de 500

mL. As fêmeas de *Meloidogyne javanica*, contidas nesse material, foram retiradas com o auxílio de um estilete de ponta recurvada e colocadas em um tubo de ensaio contendo solução-tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. No passo seguinte, as fêmeas foram esmagadas em triturador de tecidos, e depois vertidas em peneira de 0,037 mm, para retirada de restos de fêmeas e/ou ovos, obtendo-se uma suspensão límpida de endósporos, que foi quantificada através do hemacitômetro e ajustada para uma concentração de $1,75 \times 10^6$ endósporos/mL, em um tubo contendo solução-tampão fosfato de sódio, pH 7,0.

4.1.3 Montagem do ensaio

Os tratamentos consistiram de solo, esterco bovino, areia pura, além da solução-tampão fosfato de sódio, pH 7,0, como testemunha, em cinco repetições.

No tratamento 1, utilizou-se solo peneirado em malha de abertura de 0,85 mm, cuja amostra foi retirada e enviada ao Departamento de Ciências do Solo, da Universidade Federal de Lavras para análise. Nessa análise constatou-se: matéria orgânica igual a 4,1%, areia igual a 34%, silte igual a 35% e argila igual a 31%, considerado argiloso de acordo com o triângulo textural do departamento de agricultura dos Estados Unidos. No tratamento 2, utilizou-se esterco bovino, curtido e seco ao ar e peneirado em malha de abertura de 0,85 mm. No tratamento 3, utilizou-se areia pura e peneirada em malha de 0,85 mm. Na testemunha, utilizou-se apenas o tampão fosfato de sódio, pH 7,0. Verificou-se, em cada um dos tratamentos, a ausência de endósporos de *Pasteuria penetrans* através de bioteste em placas de Petri, com a adição de juvenis de *Meloidogyne javanica* e posterior extração de nematóides pela técnica de Jenkins (1964). Desta forma, montou-se o ensaio empregando-se 5 cm³ de solo, esterco bovino ou areia pura, os quais foram colocados em um tubo de ensaio com capacidade para 50 ml. Foram ainda adicionados 10 mL de solução-tampão

fosfato de sódio, pH igual 7,0, e 1 mL de suspensão de endósporos contendo $1,75 \times 10^6$ endósporos. Com um tubo fino de plástico, imerso em cada suspensão, e acoplado a uma bomba de aquário, deixou-se borbulhar ar por 72 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados cerca de 500 juvenis de *Meloidogyne javanica* em cada uma das parcelas, num total de 20 parcelas, deixando-se borbulhar por 24 horas à temperatura ambiente. No passo seguinte, o conteúdo de cada tubo de ensaio dos tratamentos 1, 2 e 3 foi centrifugado conforme a técnica de Jenkins (1964) e os juvenis extraídos foram colocados em vidros de 50 mL, em água destilada, para leitura em microscópio de objetivas invertidas. Da testemunha, cada tubo foi vertido em peneira de abertura das malhas de 0,037 mm para a lavagem dos juvenis, recolhendo-os com água destilada em vidros de 50 mL. Cada parcela consistiu da média obtida da contagem dos endósporos aderidos em 20 juvenis escolhidos ao acaso.

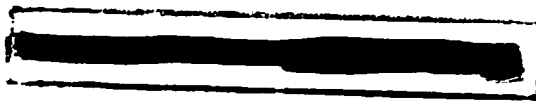
4.2 Experimento 2: efeito de substratos e da concentração de endósporos de *Pasteuria penetrans* na adesão a juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*

4.2.1 Obtenção dos juvenis e endósporos

Os juvenis de *Meloidogyne javanica* e endósporos de *Pasteuria penetrans* foram obtidos conforme descrito em 6.1 e 6.2.

4.2.2 Montagem do ensaio

Os tratamentos consistiram do mesmo solo (Tratamento 1), do mesmo esterco bovino (Tratamento 2) do experimento 1 e de folhas secas e moídas de crotalária (Tratamento 3) além de solução-tampão fosfato de sódio, considerada



testemunha, em 3 dosagens de endósporos, a saber: 10^4 , 5×10^4 e 10^5 endósporos/mL de suspensão. Para a montagem do ensaio empregaram-se cerca de 5 cm^3 de solo, esterco bovino ou crotalária moída, os quais foram colocados em um tubo de ensaio com capacidade para 50 mL, e adicionados 10 mL de solução-tampão fosfato de sódio, pH igual 7,0. Na testemunha, empregou-se apenas o tampão fosfato de sódio, pH 7,0. Em cada tubo, adicionou-se 1 mL de suspensão de endósporos contendo as respectivas concentrações de endósporos, segundo o tratamento e a repetição, num total de 60 parcelas. Com um tubo fino de plástico, imerso em cada suspensão, e acoplado a uma bomba de aquário, deixou-se borbulhar ar por 72 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados cerca de 500 juvenis de *Meloidogyne javanica* em cada uma das parcelas, deixando-se borbulhar ar por 24 horas à temperatura ambiente. No passo seguinte, o conteúdo de cada tubo dos tratamentos 1, 2 e 3 foi centrifugado conforme a técnica de Jenkins (1964) e os juvenis extraídos foram colocados em vidros de 50 mL, em água destilada, para leitura em microscópio de objetivas invertidas. Da testemunha, cada tubo foi vertido em peneira de abertura das malhas de 0,037 mm para a lavagem dos juvenis, recolhendo-os com água destilada em vidros de 50 mL. Cada parcela consistiu da média obtida da contagem dos endósporos aderidos em 20 juvenis escolhidos ao acaso. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e ao teste de Hartley (Banzatto e Kronka, 1995), no qual se verificou a homocedasticidade. Em seguida, foram submetidos à análise de variância, análise de regressão polinomial, aos testes de Tukey e desdobramentos ou médias da fonte de variação substrato x concentração de endósporos. Na análise de variância, a concentração de endósporos foi altamente significativa, e foi desdobrada na regressão polinomial para os níveis linear e quadrático.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1: efeito de substratos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*

Todos os substratos testados reduziram a adesão à cutícula dos juvenis de segundo estágio (J₂) em relação à testemunha, devido, talvez, ao efeito de cargas eletromagnéticas na superfície desses substratos, atraindo os endósporos e diminuindo a disponibilidade desses para a adesão aos J₂. Afolabi, Davies e O'Shea (1995) demonstraram que os endósporos possuem cargas negativas na sua superfície, e assim são capazes de aderir a corpos com superfícies carregadas. O borbulhamento conjunto dos endósporos e dos J₂ na presença desses substratos diminuiu as oportunidades de contacto entre eles, reduzindo a adesão dos endósporos aos juvenis. Na testemunha, a ausência desses corpos na suspensão, ou na solução-tampão, aumentou as oportunidades de contacto entre os juvenis e os endósporos.

Entre os substratos testados, a argila reduziu significativamente a adesão dos endósporos aos juvenis, quando comparada aos demais e à testemunha (Tabela 1), devido, talvez, à maior adsorção dos endósporos nos colóides da argila. Souza e Campos (1998) encontraram mais adsorção de endósporos em solo argiloso do que no solo arenoso. Devido à sua carga negativa, as partículas de argila também são capazes de atrair cátions, formando pontes com Ca²⁺ ou Mg²⁺ (Malavolta, 1980). Esses resultados estão em concordância com Mateille et al. (1996), que verificaram uma menor percolação de endósporos em solo argiloso, em comparação com o solo arenoso, e com Spaul (1984), que

verificou uma menor proporção de juvenis de *Meloidogyne* sp. infestados com endósporos de *Pasteuria* sp. em solos argilosos.

TABELA 1- Efeito do pré borbulhamento dos endósporos em substratos naturais, na adesão de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	Número médio de endósporos/J ₂
Testemunha (Tampão)	11,55 a
Areia pura	5,50 b
Esterco curtido	4,91 b
Solo argiloso	2,63 c
Média Geral	6,15

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

5.2 Experimento 2: efeito de substratos e da concentração de endósporos de *Pasteuria penetrans* na adesão a juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*

Todos os substratos submetidos ao pré borbulhamento de ar conjunto dos endósporos e juvenis reduziram a adesão à cutícula dos J₂, em relação à testemunha, corroborando os resultados obtidos no ensaio anterior. Entretanto, a crotalária moída foi o substrato que mais contribuiu para a redução da adesão (Tabela 2), devido, talvez, não só à adsorção dos endósporos nas suas partículas, mas também ao efeito de substâncias químicas liberadas pela sua trituração, afetando as proteínas e/ou carboidratos nas superfícies do endósporo

e dos juvenis, diminuindo a adesão. A matéria orgânica também é capaz de adsorver cátions em função dos grupos carboxílicos, fenólicos, alcoólicos e metoxílicos (Malavolta, 1980). Também é capaz de liberar numerosas substâncias químicas, cuja composição e concentração variam ao longo do tempo (Stirling, 1991).

TABELA 2- Efeito do pré borbulhamento dos endósporos em substratos naturais, na adesão de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis do segundo estágio J₂ de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	Número médio de endósporos/J ₂
Testemunha (Tampão)	3,09 a
Esterco curtido	0,62 b
Solo argiloso	0,54 b c
Crotalária moída	0,25 c
Média Geral	1,12

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

O aumento da concentração de endósporos na suspensão aumentou a sua densidade por J₂ (Figura 1). Adiko e Gowen (1999) também encontraram maior número de endósporos/juvenil quando na maior concentração de endósporos (10⁵ endósporos/grama de solo). Entretanto, a densidade de endósporos e o substrato em que eles estejam dispersos afetam o número de endósporos/juvenil (Tabela 3). Quando não se utilizou nenhum substrato na suspensão de endósporos e de J₂ (Tampão-testemunha), a relação densidade de endósporos na

solução e aquela nos juvenis foi direta e distinta entre eles (Tabela 3), pois não houve nenhuma obstrução à adesão. Além disso, o número de endósporos/J2 em cada uma das concentrações testadas no tratamento testemunha foi muito mais elevado do que aquele na presença de substratos chegando a ser até 12 vezes maior (Tabela 3).

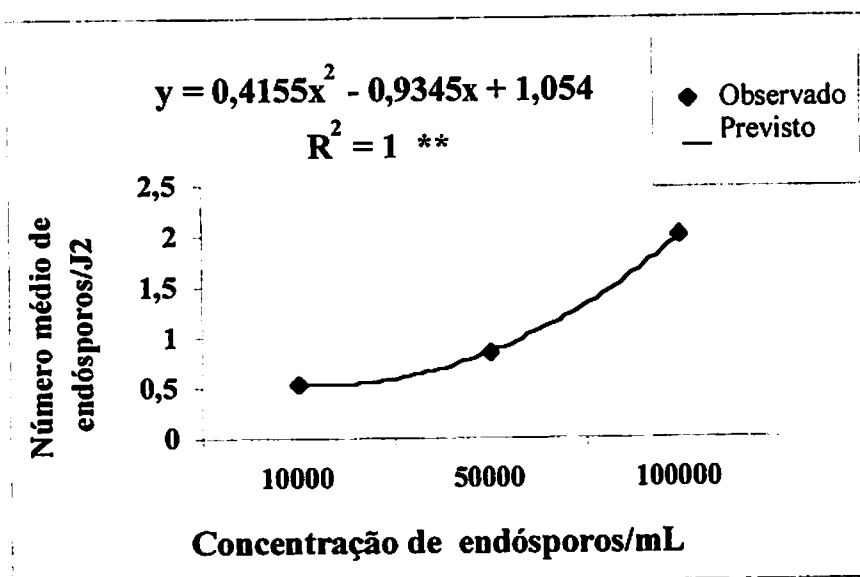


FIGURA 1- Efeito da concentração de endósporos de *Pasteuria penetrans* na adesão à cutícula de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Na presença do substrato, as duas densidades menores de endósporos não diferiram entre si com relação ao número de endósporos/J2, porém, no solo argiloso, a adesão de endósporos em J2 foi maior ($P \leq 0,05$) na concentração mais alta de endósporos do que nas demais, demonstrando que a redução da

eficácia da adesão por juvenil, devido à adsorção eletroquímica às partículas de argila, pode ser superada com o aumento significativo da densidade de endósporos na suspensão (Tabela 3). Souza e Campos (1998) verificaram que em solo argiloso é necessário um número 10 vezes maior de endósporos do que em areia para se obter o mesmo resultado na adesão, em biotestes realizados em placas de Petri. Se considerarmos as partículas do solo como esferas, cada poro seria definido por três esferas encostadas, cujos diâmetros são definidos pela fórmula $D = d\sqrt{3}/(2-\sqrt{3})$, onde D é igual ao diâmetro do poro e d é igual ao diâmetro da partícula que passará pelo poro. Considerando o endósporo de *Pasteuria* sp., d é igual 4 μm , obtendo-se D igual 26 μm . Como as partículas de argila possuem tamanho abaixo desse valor, a porosidade em solos argilosos é capaz de segurar também os endósporos, além dos nematóides (Mateille et al., 1996). Por outro lado, os endósporos podem permanecer nas partículas de argila, formando pontes catiônicas com Ca^{2+} ou Mg^{2+} , através de sua superfície de carga negativa (Mateille et al., 1996).

Na presença de crotalária triturada, a densidade de endósporos na suspensão não afetou aquela aderida ao juvenil, além de reduzir bastante o número de endósporos/ J_2 , comparado àquele na presença de esterco curtido ou solo argiloso. Nesse caso, além da adsorção de endósporos às partículas de crotalária, substâncias liberadas por essa planta na trituração devem ter afetado também a eficácia da adesão de endósporos aos juvenis (Tabela 3). Valores baixos na adesão foram obtidos quando foram usadas suspensões de endósporos, em mistura com raízes moídas, em comparação com suspensões puras de endósporos, diluídas em água de torneira (Ratnasoma e Gowen, 1996). Nesse ensaio, para se obter a adesão de 1 endósporo/juvenil foram necessários no mínimo de 10^5 endósporos/ml de suspensão de J_2 na presença de solo argiloso ou esterco curtido (Tabela 3). Nessa mesma concentração de endósporos em mistura com crotalária moída, não se conseguiu nem mesmo 1

endósporo/juvenil. Considerando que apenas 20% dos endósporos são capazes de germinar na superfície do nematóide, ou que a taxa de infectividade nas fêmeas desenvolvidas a partir de J₂ com 1 endósporo é de 20% (Rao et al., 1997), a densidade de endósporos encontrada nos J₂, juntamente com a crotalária moída, não proporcionará equilíbrio entre a população de *Pasteuria penetrans* e *Meloidogyne* spp.

TABELA 3- Efeito da concentração de endósporos de *Pasteuria penetrans* no número de endósporos/juvenil do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*, na presença de diferentes substratos.

Substrato	Concentração	Endósporos/J ₂
Crotalária moída	10 ⁴	0,16 a
	5 x 10 ⁴	0,14 a
	10 ⁵	0,44 a
Esterco curtido	10 ⁴	0,38 a
	5 x 10 ⁴	0,52 ab
	10 ⁵	0,96 b
Solo argiloso	10 ⁴	0,30 a
	5 x 10 ⁴	0,31 a
	10 ⁵	1,02 b
Tampão (testemunha)	10 ⁴	1,30 a
	5 x 10 ⁴	2,42 b
	10 ⁵	5,54 c

Dados são médias de 5 repetições e médias seguidas por letras distintas, para cada substrato, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Esses resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Stirling, Sharma e Perry (1990), que sugeriram o nível crítico de 10^5 endósporos/grama de solo e Melki et al. (1998), que obtiveram uma adesão média menor do que 1 endósporo/juvenil em solo arenoso, na concentração de 4×10^4 endósporos/grama de solo.

A movimentação do nematóide e o pH afetam a dinâmica da *Pasteuria* sp. e *Meloidogyne* spp. A textura do solo afetando a movimentação do nematóide, certamente, afetará, na mesma proporção, a infectividade por *Pasteuria penetrans*. Os diferentes níveis de pH afetarão a adesão do endósporo nos juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* spp., causando variabilidade na infectividade das populações de *Pasteuria penetrans* em solos com diferentes pH. Por outro lado, no ensaios realizados com borbulhamento de ar e controle do pH, os endósporos e os nematóides foram jogados constante e aleatoriamente no movimento do ar e da água, anulando-se o movimento espontâneo dos nematóides.

A relação entre a densidade de endósporos dispersa no solo e aquela no juvenil em condições de campo será afetada por vários outros fatores, além dos acima citados, como a desuniformidade na distribuição dos endósporos e a movimentação dos juvenis afetada pela temperatura do solo.

7 CONCLUSÕES

- 1 Os substratos orgânico e mineral e o solo argiloso, *in vitro* e sob pré borbulhamento de ar em tubos de vidro contendo as suspensões de *Pasteuria penetrans* e J2 de *Meloidogyne javanica*, foram capazes de reduzir a adesão dos endósporos aos nematóides.
- 2 O solo argiloso e a crotalária moída proporcionaram maior redução na adesão dos endósporos aos J2 de *Meloidogyne javanica* do que a areia e/ou esterco bovino curtido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIKO, A.; GOWEN, S.R. The parasitic activity of *Meloidogyne incognita* as affected by the dynamics of acquisition of *Pasteuria penetrans* spores. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v.27, p.21-26, June 1999.
- AFOLABI, P.; DAVIES, K.G.; O'SHEA, P.S. The eletrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.244-249, Mar 1995.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: Funep, 1995. 247 p.
- CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W.; McSORLEY, R.; MITCHELL, D.J.; HEWLETT, T.E. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.28, n.2, p.159-168, 1996.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St Paul, v.57, p.1025-1028, 1973.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, n.9, p.692, Sept. 1964.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: E. Agronômica Ceres, 1980. 255p.
- MATEILLE, T.; DUPONNOIS, R.; DABIRÉ, K.; N'DIAYE, S.; DIOP, M.T. Influence of the soil on the transport of the spores of *Pasteuria penetrans*, parasite of nematodes of the genus *Meloidogyne*. **European Journal of Soil Biology**, Elsevier , v.32, n.2, p.81-88, 1996.

- MATEILLE, T.; DUPONNOIS, R.; DIOP, M.T. Influence des facteurs telluriques abiotiques et de la plante hôte sur l'infection des nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne* par l'actinomycète parasitoïde *Pasteuria penetrans*. *Agronomie*, Elsevier, v.15, p.581-591, 1995.
- MELKI, K.C.; GIANNAKOU, I.O.; PEMBROKE, B.; GOWEN, S.R. The cumulative build-up of *Pasteuria penetrans* spores in root-knot nematode infested soil and the effect of soil applied fungicides on its infectivity. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge Cedex, v.21, n.6, p.679-683, 1998.
- RAO, M.S.; GOWEN, S.R.; PEMBROKE, B.; REDDY, P.P. Relationship of *Pasteuria penetrans* spore encumbrance on juveniles of *Meloidogyne incognita* and their infection in adults. *Nematologia Mediterranea*, Bari, v.25, n.1, p.129-131, June 1997.
- RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R. Spore attachment of *Pasteuria penetrans* on juveniles of *Meloidogyne incognita* as affected by pH and organic matter. *Nematologia Mediterranea*, Bari, v.24, n.2, p.283-285, Dec. 1996.
- SOUZA, J.T. de; CAMPOS, V.P. Quantificação de endósporos de *Pasteuria penetrans* em solo e raízes. *Nematologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.1, p.22-31, 1998.
- SPAULL, V.W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. *Revue de Nématologie*, Montrouge Cedex, v.7, n.3, p.277-282, 1984.
- STIRLING, G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International, 1991. 282p.
- STIRLING, G.R.; SHARMA, R.D.; PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. *Nematologica*, Leiden, v.36, p.246-252, 1990.

CAPÍTULO 7

Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em área naturalmente infestada por *Pasteuria penetrans*

1 RESUMO

MAXIMINIANO, C. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em cafezal naturalmente infestado por *Pasteuria penetrans*. In: Fatores envolvidos na adesão e infectividade de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.110-126. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Estudou-se a flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* associada a *Pasteuria penetrans* em uma área de cafeeiros com idade superior a 10 anos e naturalmente infestada por *Meloidogyne exigua* e *Pasteuria penetrans*. Escolheram-se 15 cafeeiros infestados e de cada um foram coletados 500 g de solo, mensalmente entre os dias 20 e 25 de cada mês. De cada amostra extraíram-se os nematóides em 5 subamostras de 100 cm³ através da técnica de Jenkins (1964). Os juvenis de *Meloidogyne exigua* foram examinados sob o microscópio de objetivas invertidas, e foram determinados o número de endósporos/J₂ e o número de J₂ não parasitados. A porcentagem de infestação em J₂ pela *Pasteuria penetrans* variou em média de 21% a 65% e o número médio de endósporos/ J₂ variou de 2,1 a 9,2, com aumentos na primavera. A densidade média de J₂ de *Meloidogyne exigua* no solo variou de 15 a 104 por 100 cm³ de solo, ocorrendo aumento nos meses de março e abril. Observou-se correlação significativa ($r = 0,58$; $P = 0,0489$) entre o número médio de endósporos/ J₂ e a porcentagem de infestação dos J₂, e entre a temperatura média do ar e o número médio de endósporos/ J₂ ($r = 0,55$; $P = 0,0626$), durante o período em estudo.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

MAXIMINIANO, C. Population fluctuation of *Meloidogyne exigua* in coffee plantation naturally infested by *Pasteuria penetrans*. In: Factors involved on adhesion and infectivity of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 2000. p.110-126. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Populational fluctuation of *Meloidogyne exigua* associated to *Pasteuria penetrans* was studied in a 10 years old coffee plantation area naturally infested by both organisms. Fifteen infested coffee trees were selected for the experiment. From them, 500 g of soil were collected monthly. This sample was split into 5 of 100 cm³ of soil and from them were extracted nematodes by Jenkins (1964) technique. The extracted second stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne exigua* were observed in a microscopy with inverted objectives and counted the number of J₂ parasitized or not by *Pasteuria penetrans* and the number of endospores/J₂, as well. The percentage of infested J₂ by *Pasteuria penetrans* varied from 21% to 65%. The number of endospores/J₂ varied from 2.1 to 9.2 increasing in the spring. *Meloidogyne exigua* J₂ population density in the soil varied from 15 to 104 per 100 cm³ with a population increase in March and April. Significant correlations ($r = 0.58$; $P = 0.0489$) between number of endospores/J₂ and percentage of J₂ infestation, air temperature and number of endospores/J₂ ($r = 0.55$; $P = 0.0626$) were observed.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 15 espécies de *Meloidogyne* Goeldi têm sido relatadas como parasitas ou associadas aos cafeeiros em todo o mundo (Campos, Sivapalam e Gnanapragasam, 1990; Araya e Caswell-Chen, 1995; Campos, 1997). Dentre elas, *Meloidogyne exigua* Goedi, 1887, é a mais disseminada nos cafezais do Brasil (Campos, Lima e Almeida, 1985), e se constitui num dos principais patógenos do cafeeiro na maioria das áreas produtoras de café da América Central e do Sul (Campos, Sivapalam e Gnanapragasam, 1990). O estudo da flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* foi realizado em cafeeiros no sul de Minas Gerais, com o objetivo de conhecer as mudanças na população em função das estações climáticas (Huang, Souza e Campos, 1984).

A bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre e Starr, candidata ao controle biológico de fitonematóides, foi registrada pela primeira vez no Brasil, em 1966, por Lordello em material coletado de tomateiros infestados com *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. O primeiro registro de *Pasteuria penetrans* parasitando *Meloidogyne exigua* foi feito na Colombia, por Baeza-Aragón, em 1978, observando raízes infestadas de *Coffea arabica*, e no Brasil por Sharma e Lordello em 1992, observando plantações infestadas no Estado de São Paulo. O estudo da flutuação populacional dessa bactéria, associada a *Meloidogyne* spp., em áreas naturalmente infestadas, tem sido realizado em algumas culturas e regiões do mundo (Verdejo-Lucas, 1992; Ciancio, Mankau e Mundo-Ocampo, 1992; Souza, Souza e Campos, 1996; Atibalentja et al., 1998; Souza e Campos, 1999). No entanto, as observações até aqui realizadas, são insuficientes para o entendimento dos fatores que influenciam o mecanismo *Pasteuria-Meloidogyne-Planta* ao longo do tempo.

Esse trabalho teve como objetivo estudar a flutuação populacional de *Pasteuria penetrans* associada a *Meloidogyne exigua* em uma área naturalmente infestada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se no ensaio, uma área de cafeeiros com idade superior a 10 anos e naturalmente infestada por *Meloidogyne exigua* e *Pasteuria penetrans*, no período de abril de 1998 a março de 1999, no município de São João Del Rey, Minas Gerais. Para certificar-se dessa infestação natural, 20 amostras de raízes de cafeeiro foram coletadas nessa área, e no laboratório foram processadas e extraídas as fêmeas. Em uma lâmina de vidro, essas fêmeas foram esmagadas e verificou-se o parasitismo através da extrusão dos endósporos. A seguir, foram realizados os cortes perineais e as observações em lâminas de vidro para a identificação da espécie segundo Taylor e Sasser (1978). Escolheram-se 15 cafeeiros infestados, e cada um constituiu uma parcela. Retirou-se também uma amostra composta de solo para análise da textura de solo, pH em água e teor de matéria orgânica, a qual foi enviada ao Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, MG. Mensalmente, e entre os dias 20 e 25 de cada mês, foram coletadas 15 amostras de 500g de solo na rizosfera dos cafeeiros. De cada amostra de 500g de solo extraíram-se os nematóides em 5 subamostras de 100 cm³, até 3 dias após a coleta, pela técnica de centrifugação e flotação em solução de sacarose (Jenkins, 1964). Em cada amostra, os juvenis de *Meloidogyne exigua* foram examinados mensalmente sob o microscópio de objetivas invertidas, determinado-se o número de endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos a cada juvenil de segundo estágio por amostra de 100 cm³ de solo. Com isso, determinou-se o número de juvenis do segundo estágio infestados ou não com endósporos de *Pasteuria penetrans*, obtendo-se também o número total de juvenis por amostra. Os dados de temperatura média diária do ar e de precipitação foram obtidos na estação climatológica do município, para o período em estudo. Utilizou-se o programa estatístico SAS System para o

cálculo das correlações. A densidade média mensal da população de juvenis de segundo estágio no solo, número de endósporos por juvenil e porcentagem de infestação de endósporos em juvenis foram correlacionados entre si e cada um desses com a temperatura média mensal e com a precipitação pluviométrica total do mês. As temperaturas médias variáveis com variação de 1 a 30 dias, antecedentes ao dia 20 e subsequentes ao dia 25 de cada mês, também foram correlacionadas com a densidade média populacional, número médio mensal de endósporos e porcentagem de infestação dos juvenis pelos endósporos. O resultado da análise de textura do solo mostrou o seguinte resultado: Argila = 34%; Areia = 41%; Silte = 25%, Matéria orgânica = 6,91% e pH em água = 5,3, sendo caracterizado como solo de textura argilosa, com acidez média, conforme triângulo para textura do U.S.D.A., **United States Department of Agriculture** .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A densidade populacional de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne exigua* foi mais elevada em abril, decrescendo até agosto-setembro e se elevando moderadamente a partir de então até março (Figura 1 A), com variação de 15 a 104 juvenis/100 cm³ de solo e média de 34 juvenis/100 cm³ de solo. Nesse período houve uma seca prolongada, com grande déficit hídrico de abril a setembro causando declínio rápido na população de *Meloidogyne exigua*. Huang, Souza e Campos (1984) verificaram que a população de juvenis *Meloidogyne exigua* em cafeeiros localizados no Sul de Minas Gerais aumentou no mês de setembro, com o incremento da temperatura e precipitação pluviométrica, permanecendo alta até o final do outono. Souza, Souza e Campos (1996), Dinardo-Miranda, Spironello e Martins (1997), Pan, Hu e Lin (1999) e Souza e Campos (1999) verificaram alta densidade populacional de *Meloidogyne* spp. na primavera, a qual, em latitudes próximas ao trópico no hemisfério sul, coincide com o aumento da temperatura e precipitação pluviométrica.

A porcentagem de infestação de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne exigua* foi de 38,34% em abril aumentando moderadamente até outubro quando chegou a 65,25%, e decresceu a partir de então até março, com valores de 21,23% (Figura 1 B). Observa-se, portanto, que a infestação dos J₂ pela *Pasteuria penetrans* foi alta quando a densidade populacional de J₂ era baixa (Figura 3 A e B), devido, talvez, ao fato de que durante a primavera, a quantidade de raízes novas emitidas pelos cafeeiros é pequena, fazendo com que os juvenis tenham que percorrer distâncias maiores no solo, aumentando as chances de encontro com os endósporos da *Pasteuria penetrans*, e conseqüentemente aumentando a porcentagem de infestação. No final do verão e

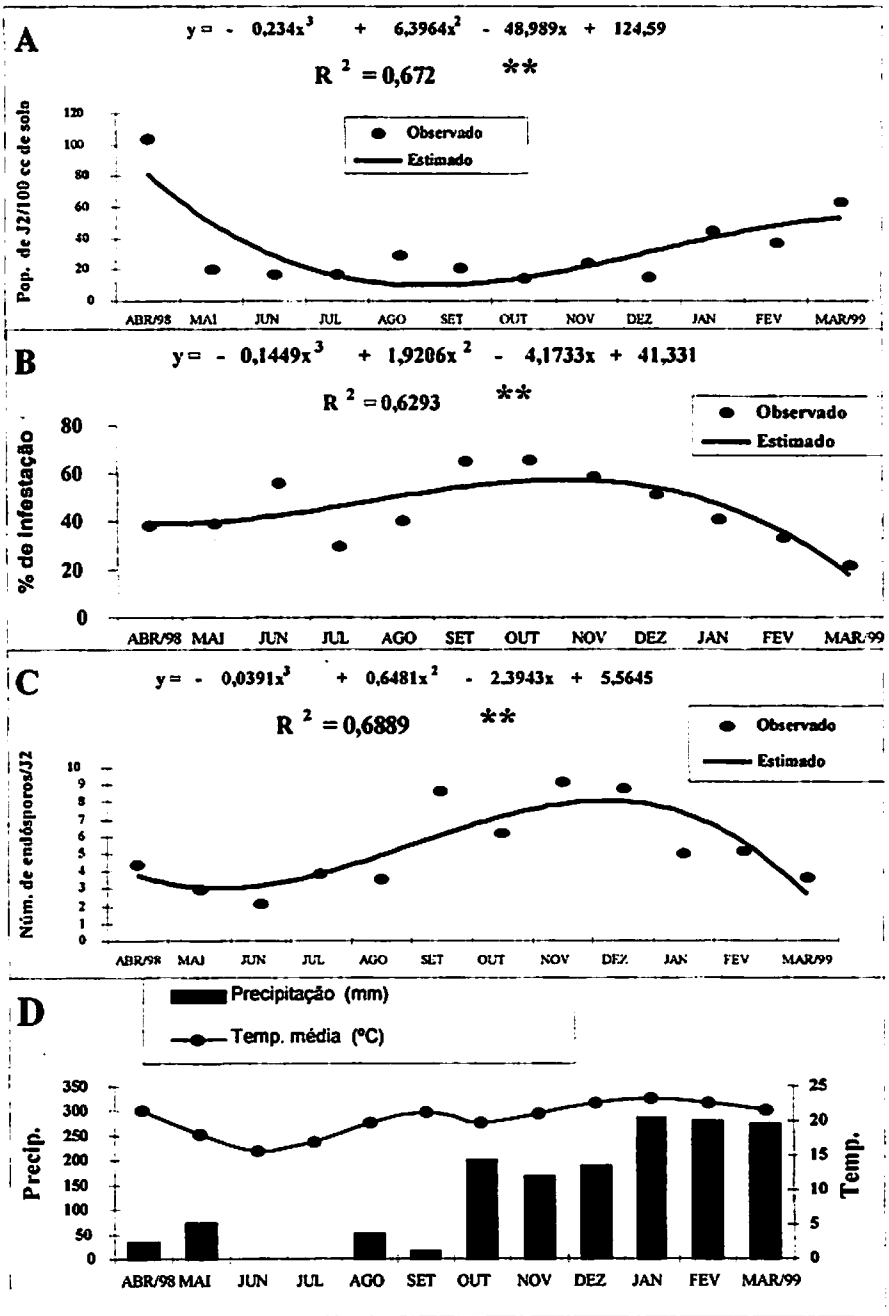


FIGURA 1- Flutuação populacional anual de *Meloidogyne exigua* e *Pasteuria penetrans* em cafezal no campo. A) População de J2 de *M.exigua*. B) Percentagem de infestação de *P. penetrans* em J2 de *M. exigua*. C) Densidade de endósporos de *P. penetrans*/J2 de *M.exigua*. D) Temperatura média e precipitação pluviométrica durante 12 meses.

outono ocorre o inverso, com muitas raízes novas e pouca distância de movimentação dos juvenis. Essa distância está diretamente correlacionada com a porcentagem de infestação (Stirling, Sharma e Perry, 1990). Nesse ensaio, a maior porcentagem de infestação foi de 65,25%, a qual é bem superior a todas aquelas encontradas noutros experimentos realizados por Ciancio, Mankau e Mundo-OCampo (1992), Verdejo-Lucas (1992) e Souza e Campos (1999), quais sejam 29,5%, 18% e 50%, respectivamente.

O número de endósporos/J2 foi baixo em abril-maio e aumentou a partir de então até dezembro, quando declinou até março (Figura 1 C), aproximando-se do comportamento da curva de infestação (Figura 1 B), devido, talvez, à coincidência com o período de maior movimentação dos juvenis para alcançar as raízes novas dos cafeeiros. Nesse período do ano, a temperatura média do ar e a precipitação pluviométrica tendem a aumentar (Figura 1 D). Em média, os juvenis de *Meloidogyne exigua* tiveram 5,3 endósporos aderidos à cutícula, com variação de 2,1 a 9,2 (Figura 1 C). Com relação à temperatura, sabe-se que a adesão dos endósporos aumenta à medida que a temperatura do solo aumenta, ocorrendo máxima adesão na faixa de 20 a 30°C (Stirling, 1981; Hatz e Dickson, 1992; Freitas, Mitchell e Dickson, 1997). Por outro lado, no inverno ocorreu provavelmente o inverso, com a temperatura inadequada para a adesão dos endósporos e também para a movimentação dos juvenis no solo. Sabe-se que a motilidade dos juvenis de *Meloidogyne* spp. é menor em baixas temperaturas (Thomason, Van Gundy e Kirkpatrick, 1964). Neste caso, as chances do encontro entre o nematóide e os endósporos de *Pasteuria penetrans* são menores e conseqüentemente menor é o número de endósporos aderidos por juvenil.

Não foram verificadas correlações significativas entre a densidade populacional de juvenis de *Meloidogyne exigua* e precipitação pluviométrica ($r = 0,11$; $P = 0,7258$), ou entre densidade populacional e temperatura do ar ($r = 0,40$; $P = 0,1970$), contrariando o esperado. É provável que a *Pasteuria*

penetrans esteja mantendo a população de *Meloidogyne exigua* em baixa densidade durante a primavera até o início do outono.

Não se verificaram correlações entre porcentagem de infestação e temperatura média do ar ($r = 0,08$; $P = 0,8063$), ou entre precipitação pluviométrica e porcentagem de infestação ($r = -0,22$; $P = 0,4824$) ou número médio de endósporos/juvenil ($r = 0,22$; $P = 0,4854$), contrariando os resultados de outros autores, que verificaram o favorecimento da umidade na infestação dos juvenis por *Pasteuria penetrans* (Souza e Campos, 1999), talvez explicado pela ocorrência de um ano atípico com seca prolongada. É provável também que durante o período de outono-inverno, a baixa umidade do solo e a temperatura em queda tenham influenciado a queda na densidade populacional de *Meloidogyne exigua*.

Por outro lado, verificou-se uma correlação entre a temperatura média do ar e o número médio de endósporos/juvenil ($r = 0,55$; $P = 0,0626$), que deve ser considerada significativa, como se verá adiante. Também não se verificou correlação entre densidade de juvenis no solo e porcentagem de infestação ($r = -0,47$; $P = 0,1203$). Talvez o período de um ano seja um prazo pequeno para se verificar o aumento significativo de endósporos no solo. Esses resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Verdejo-Lucas (1992), que não encontrou correlação entre densidade populacional e porcentagem de infestação. A porcentagem de infestação está diretamente correlacionada com a concentração de endósporos no solo (Stirling, Sharma e Kerry, 1990), e além disso, *Pasteuria penetrans* necessita de muitos anos para alcançar concentrações de endósporos no solo que possam ser realmente detectadas (Stirling, 1982).

Observou-se correlação significativa entre o número médio de endósporos/juvenil e a porcentagem de infestação ($r = 0,58$; $P = 0,0489$) (Figura 2). Ambos os fatores foram afetados pela temperatura do ar, diretamente sobre a adesão dos endósporos e indiretamente pela distância de movimentação dos

juvenis de *Meloidogyne exigua*. Neste caso, a correlação positiva entre esses dois fatores é consistente, embora não tenha existido correlação significativa entre temperatura média do ar e porcentagem de infestação dos juvenis pela *Pasteuria penetrans*. Ciancio, Mankau e Mundo-OCampo (1992) e Atibalentja et al. (1998) também verificaram correlações significativas entre o número médio de endósporos por nematóide ou juvenil e a porcentagem de infestação dos nematóides ou dos juvenis no solo, respectivamente.

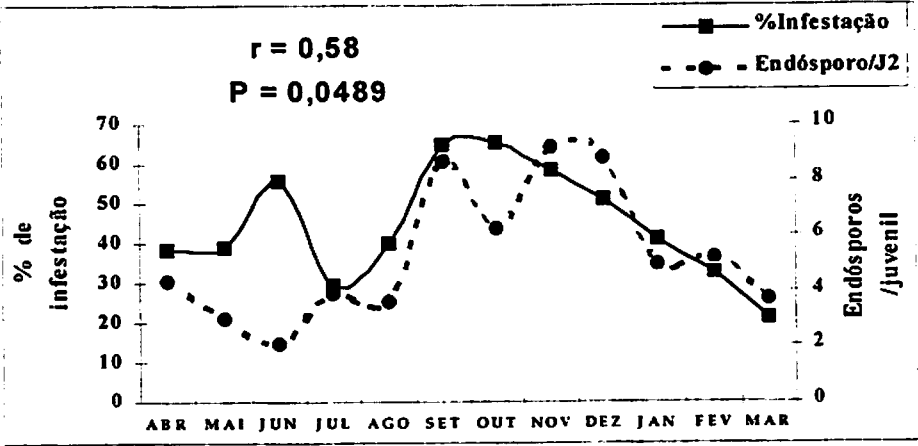


FIGURA 2- Correlação entre número médio de endósporos por juvenil do segundo estágio (J2) e a porcentagem de infestação desses juvenis, durante o ano.

Correlações significativas ocorreram entre o número de endósporos/juvenil e as médias de temperaturas do ar obtidas com a variação do número de dias, para 20 dias ou mais, subsequentes ao dia 20 de cada mês do ano (Figura 3). Neste caso, o coeficiente de correlação $r = 0,55$ e $P = 0,0626$ obtidos para a correlação entre a temperatura média mensal e o número médio

de endósporos/juvenil é consistente, mostrando que um mês é um período longo para se correlacionar dados de temperatura.

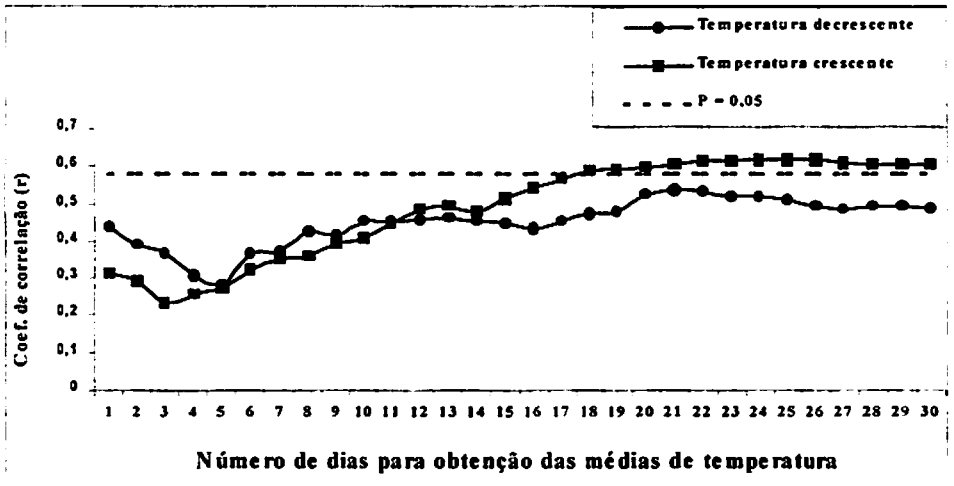


FIGURA 3- Coeficientes de correlações obtidos entre número de endósporos/juvenil e as médias de temperatura do ar, obtidas com a variação do número de dias, subsequentes e antecedentes ao dia 20 de cada mês.

CONCLUSÕES

- 1 A densidade média de J₂ de *Meloidogyne exigua* no solo aumentou durante o outono e permaneceu baixa durante o resto do ano.
- 2 Houve correlação significativa entre o número médio de endósporo/J₂ e a porcentagem de infestação dos J₂ ($r = 0,58$; $P = 0,0489$), e entre a temperatura média do ar e o número médio de endósporos/J₂ ($r = 0,55$; $P = 0,0626$).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAYA, M.; CASWELL-CHEN, E.P.. *Coffea arabica* cvs. Caturra and Catuai Nonhosts to a California isolate of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**, Quincy, v.25, n.2, p.165-171, Dec. 1995.
- ATIBALENTJA, N.; NOEL, G.R.; LIAO, T.F.; GERTNER, G.Z.. Population Changes in *Heterodera glycines* and its Bacterial Parasite *Pasteuria* sp. in Naturally Infested Soil. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.30, n.1, p.81-92, Mar. 1998.
- BAEZA-ARAGÓN, C.A. Parasitismo de *Bacillus penetrans* en *Meloidogyne exigua* establecido en *Coffea-arabica*. **Cenicafé**, Chinchiná, v.29, n.3, p.94-27, Jul/Set. 1978.
- CAMPOS, V.P. Controle de doenças: doenças causadas por nematóides. In: RIBEIRO DO VALE, F.X.; ZAMBOLIM, L. (eds). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Editora Universitária, 1997. v.1, p.141-170.
- CAMPOS, V.P.; LIMA, R. D.; ALMEIDA, V.F. Nematóides parasitas do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.50-58, Jun. 1985.
- CAMPOS, V.P.; SIVAPALAM, P.; GNANAPRAGASAM, N.C. Nematodes parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (eds). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. Wallingford UK: CAB Internacional, 1990. p.387-429.
- CIANCIO, A.; MANKAU, R.; MUNDO-OCAMPO, M.. Parasitism of *Helicotylenchus lubus* by *Pasteuria penetrans* in naturally infested soil. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.1, p.29-35, Mar. 1992.

- DINARDO-MIRANDA, L.L.; SPIRONELLO, A.; MARTINS, A.L.M. Dinâmica populacional de nematóides fitoparasitos em cultura de abacaxi. **Nematologia Brasileira**, Pelotas, v.21, n.1, p.49-57, 1997.
- FREITAS, L.G.; MITCHELL, D.J.; DICKSON, D.W. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race I. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.29, n.4, p.547-555, Dec. 1997.
- HATZ, B.; DICKSON, D.W. Effect of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.4, p.512-521, Dec. 1992.
- HUANG, S.P.; SOUZA, P.E.; CAMPOS, V.P.. Seasonal Variation of a *Meloidogyne exigua* Population in a Coffee Plantation. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.16, n.1, p.115-117, Mar. 1984.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St Paul, v.48, n.9, p.692, 1964.
- LORDELLO, L.E.G. Nota sobre um parasito de nematóide. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.41, n.2, p.67-69, Jun. 1966.
- PAN, C.; HU, X.; LIN, J. Temporal fluctuations in *Meloidogyne fujianensis* parasitizing *Citrus reticulata* in Nanjing, China. **Nematologia mediterrânea**, Bari, v.27, p.327-330, 1999.
- SHARMA, R.D.; LORDELLO, R.R.A. Occurrence of *Pasteuria penetrans* in coffee plantations infested by *Meloidogyne exigua* in the state of São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 25., 1992, Gramado. **Resumos...Gramado: SBF**, 1992. p.183.

- SOUZA, J. T.; CAMPOS, V.P.. Flutuação Populacional de Fitonematoides associados a *Pasteuria* spp. em duas áreas Naturalmente infestadas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2, p.339-344, Abr./Jun. 1999.
- SOUZA, J. T.; SOUZA, R.M.; CAMPOS, V.P.. Ocorrência e Flutuação Populacional de *Pasteuria* spp. em Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.20, n.2, p.41-51, 1996.
- STIRLING, G.R. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australian vineyards. **Plant Disease**, St Paul, v.66, n.1, p.52-53, 1982.
- STIRLING, G.R. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.27, n.4, p.458-462, Out. 1981.
- STIRLING, G.R.; SHARMA, R.D.; PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. **Nematologica**, Leiden, v.36, p.246-252, 1990.
- TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)**. Raleigh: North Carolina State University, 1978. 111p.
- THOMASON, I.J.; VAN GUNDY, S.D.; KIRKPATRICK, J.D. Motility and infectivity of *Meloidogyne javanica* as affected by storage time and temperature in water. **Phytopathology**, St Paul, v.54, p.192-195, 1964.
- VERDEJO-LUCAS, S. Seasonal Population Fluctuations of *Meloidogyne* spp. and the *Pasteuria penetrans* Group in Kiwi Orchards. **Plant Disease**, St Paul, v.76, n.12, p.1275-1279, Dec. 1992.

ANEXOS

ANEXO A

Página

TABELA 1A - Adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*; A) Efeito do tempo de borbulhamento em horas (hs), B) Efeito da concentração de endósporos.....42

TABELA 1A - Efeito de enzimas nas adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis de *Meloidogyne javanica*.....58

Resumo da análise de variância para: efeito de enzimas na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*.

Experimento 1

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Tratamento	4	227,0086	18,95 **
Residuo	20	11,9782	
Total	24		

CV% = 21,2224

TABELA 2A - Efeito do pré-tratamento de endósporos e da concentração de pectinase na adesão de *Pasteuria penetrans* à cutícula de J₂ de *Meloidogyne javanica*.....59

Resumo da análise de variância para: efeito de enzimas na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*.

Experimento 2

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Tratamento	4	300,2573	20,85 **
Residuo	20	14,3999	
Total	24		

CV% = 43,61

TABELA 3A - Efeito do pré-tratamento com pectinase e tratamento térmico de endósporos na adesão de *Pasteuria penetrans* à cutícula de juvenis de *Meloidogyne javanica*.....61

Resumo da análise de variância para: efeito de enzimas na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*.

Experimento 3

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Tratamento	4	85,79871	71,12 **
Residuo	20	1,20639	
Total	24		

CV% = 8,1592

TABELA 1A - Efeito de filtrados bacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* à cutícula de *Meloidogyne javanica*.....74

Resumo da análise de variância para: efeito de filtrados rizobacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Tratamento	4	84,87923	71,883 **
Residuo	20	1,18079	
Total	24		

CV% = 18,5497

TABELA 1A - Porcentagem de infectividade causada por *Pasteuria penetrans* em fêmeas de *Meloidogyne javanica* e de *Meloidogyne incognita* raças 1, 2, 3 e 4.....86

Resumo da análise de variância para : influência das raças de *Meloidogyne incognita* na infectividade de *Pasteuria penetrans*.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Tratamento	4	0,3504	24,00 **
Residuo	20	0,0146	
Total	24		

CV% = 42,54

TABELA 1A - Efeito do pré-borbulhamento dos endósporos em substratos naturais na adesão de *Pasteuria penetrans* à cutícula de *Meloidogyne javanica*.....101

Resumo da análise de variância para: efeito da matéria orgânica e textura do solo na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*.

Experimento 1

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Tratamento	3	72,46497	92,824 **
Residuo	16	0,78067	
Total	19		

CV% = 14,3761

TABELA 2A – Efeito do pré-borbulhamento dos endósporos em substratos naturais na adesão de *Pasteuria penetrans* à cutícula de *Meloidogyne javanica*..... 102

Resumo da análise de variância para: efeito da matéria orgânica e textura do solo na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*

Experimento 2

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Substrato	3	26,06482	182,671 **
Concentração	2	11,73329	82,231 **
Subs x Conc	6	4,61874	32,370 **
Residuo	48	0,14269	
Total	59		

CV% = 33,6018

TABELA 3A - Efeito da concentração de endósporos de *Pasteuria penetrans* no número de endósporos por J₂ de *Meloidogyne javanica*, na presença de diferentes substratos.....105

- FIGURA 1B – Endósporos de *Pasteuria penetrans* liberados de fêmea de *Meloidogyne* sp.....07
- FIGURA 1B - Número de endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos por juvenil de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica* segundo o pH da suspensão.....41

Resumo da análise de variância para Efeito do pH na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em juvenis de *Meloidogyne javanica*.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
pH	4	0,1469	56,90 **
Concentração	1	0,0461	17,85 **
Tempo	1	0,0508	19,70 **
pH x Conc	4	0,0063	2,43 ns
pH x Tempo	4	0,0072	2,80 *
Conc x Tempo	1	0,0010	0,37 ns
pH x Conc x Tempo	4	0,0096	3,74 **
Residuo	80	0,0026	
Total	99		

CV% = 2,1360

Análise de variância para estudo da regressão em efeito do pH na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em J₂ de *Meloidogyne javanica*.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Regressão quadrática	1	0,7200	276,25 **
Desvios de regressão	2		
Residuo	80	0,0026	
Total	99		

FIGURA 1B - Efeito da concentração de endósporos de *Pasteuria penetrans* na adesão à cutícula de J2 de *Meloidogyne javanica*.....103

FIGURA 1B - Flutuação populacional anual de *M. exigua* e *P. penetrans* em cafezal no campo. A) População de (J2) de *M.exigua*. B) Porcentagem de infestação de *P. penetrans* nos (J2) de *M. exigua*. C) Densidade de endósporos de *P. penetrans* nos (J2) de *M. exigua*. D) Temperatura média e precipitação pluviométrica durante 12 meses.....118

Resumos das análises de variância e de regressão polinomial para população de J2 de *M. exigua* no solo, porcentagem de infestação em J2 e número de endósporos de *P. penetrans*/ J2.

Análise de variância para estudo da população de J2 de *Meloidogyne exigua* no solo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Meses	11	4882,36	7,43 **
Residuo	72	657,44	
Total	83		

CV% = 75,37

Análise de variância para estudo da regressão em população de J2 de *Meloidogyne exigua* no solo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Regressão linear	1	213,36	0,32 ns
Regressão quadrática	1	31434,35	47,81 **
Regressão cúbica	1	4439,46	6,75 **
Desvios de regressão	8		
Resíduo	72	657,44	
Total	83		

Análise de variância para estudo da porcentagem de infestação de *P. penetrans* em J2 de *Meloidogyne exigua* no solo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Meses	11	1410,09	4,99 **
Resíduo	72	282,28	
Total	83		

CV% = 37,51

Análise de variância para estudo da regressão em porcentagem de infestação de *P. penetrans* em J2 de *M. exigua* no solo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Regressão linear	1	417,07	1,48 ns
Regressão quadrática	1	7639,72	27,06 **
Regressão cúbica	1	1702,78	6,03 **
Desvios de regressão	8		
Resíduo	72	282,28	
Total	83		

Análise de variância para estudo do número de endósporos de *P. penetrans*/J₂ de *Meloidogyne exigua* no solo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Meses	11	40,48	7,40 **
Residuo	72	5,47	
Total	83		

CV% = 44,13

Análise de variância para estudo da regressão em número de endósporos de *P. penetrans*/J₂ de *Meloidogyne exigua* no solo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	Fc
Regressão linear	1	61,86	11,32 **
Regressão quadrática	1	120,97	22,13 **
Regressão cúbica	1	123,92	22,67 **
Desvios de regressão	8		
Residuo	72	5,47	
Total	83		

FIGURA 2B - Correlação entre número médio de endósporos por juvenil e a porcentagem de infestação dos juvenis durante o ano.....121

Coeficientes de correlação de Pearson/Probabilidade obtidos entre os dados referentes ao estudo da flutuação populacional de *Pasteuria penetrans* associada a *Meloidogyne exigua*, analisado pelo SAS System.

	% infest.	End./J2	D. Pop.	T. média	Precip.
% infest.	1,0000	0,5783 *	-0,4731	-0,0793	-0,2248
	0,0	0,0489	0,1203	0,8065	0,4824
End./J2	0,5783 *	1,0000	-0,2345	0,5523	0,2233
	0,0489	0,0	0,4632	0,0626	0,4854
D. Pop.	-0,4731	-0,2345	1,0000	0,4005	0,1133
	0,1203	0,4632	0,0	0,1970	0,7258
T. média	-0,0793	0,5523	0,4005	1,0000	0,6987 *
	0,8065	0,0626	0,1970	0,0	0,0115
Precip.	-0,2248	0,2233	0,1133	0,6987 *	1,0000
	0,4824	0,4854	0,7258	0,0115	0,0

FIGURA 3B-Coefficientes de correlações obtidos entre número de endósporos/juvenil e diferentes temperaturas médias do ar, obtidas com a variação do número de dias, subsequentes e antecedentes ao dia 20 de cada mês.....122