

# EFEITO DE RIZOBACTERIAS NA ADESAO DE ENDÓSPOROS DE *Pasteuria penetrans* EM JUVENIS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE *Meloidogyne javanica*<sup>1</sup>

Leandro G. Freitas<sup>2</sup>  
Fábio R. Alves<sup>2</sup>  
Mauro J. N. Costa<sup>2</sup>  
Silamar Ferraz<sup>2</sup>

## RESUMO

A primeira etapa no parasitismo de *Meloidogyne* spp. por *Pasteuria penetrans* é a adesão dos endósporos dessa bactéria à cutícula dos nematóides, que pode ser aumentada por fatores biológicos ou físicos. Suspensões de *P. penetrans* foram concentradas por centrifugação, ressuspendidas e incubadas por cinco dias a 27°C em suspensão aquosa contendo, separadamente, dois isolados de rizobactérias (ALT-7 e MI-6) antagonistas a *M. javanica*. Após a incubação, 200 J2 de *M. javanica* em 1 mL de água foram adicionados por tubo e centrifugados a 400 G (1.500 rpm), por 20 minutos, para fazer o contato entre endósporos e nematóides. ALT-7 e MI-6 diminuíram a adesão de endósporos, quando comparados à água, em 91,5 e 51,6% ( $P \geq 0,05$ ), respectivamente. Essa redução pode ser devido a compostos liberados durante o crescimento da rizobactéria no meio, os quais podem degradar ou alterar as substâncias responsáveis pelo reconhecimento dos endósporos pela cutícula dos nematóides.

Palavras-chave: nematóide, parasitismo.

## ABSTRACT

### EFFECT OF RHIZOBACTERIA ON THE ATTACHMENT OF *Pasteuria penetrans* ENDOSPORES TO SECOND STAGE JUVENILES OF *Meloidogyne javanica*

The first step in the parasitism of *Meloidogyne* spp. by *Pasteuria penetrans* is the attachment of the spores to the nematode cuticle, which can be enhanced by physical or biological factors. Spore suspensions of *P. penetrans* were concentrated by centrifugation, resuspended and incubated in aqueous suspensions of one of the two rhizobacteria isolates (ALT-7 and MI-6), antagonistic to *M. javanica*, for 5 days at 27°C. After incubation, 200

---

<sup>2</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG.  
E-mail: ds41763@correio.cpd.ufv.br

J2 in 1 mL of water were added per tube and centrifuged at 400 G (1500 rpm) for 20 minutes to promote the contact between spores and nematodes. ALT-7 and MI-6 decreased the endospore attachment, when compared to the control treatment, in 91.5 and 51.6% ( $P \leq 0.05$ ), respectively. This reduction might be due to chemical products of rhizobacteria growth in the medium, which might have degraded or altered the substances responsible for the recognition of the spores by the nematode cuticle.

Key words: nematode, parasitism.

*Pasteuria penetrans* Thorne, 1940 é um parasita obrigatório de *Meloidogyne* spp. e possui grande potencial para controle biológico desses nematóides (2, 5, 6). Como o processo de infecção depende da adesão dos endósporos de *P. penetrans* à cutícula do nematóide, várias tentativas têm sido feitas com a finalidade de aumentar a eficiência da adesão, uma vez que já se observou que apenas 20% dos endósporos que se aderem ao corpo dos nematóides germinam (11). Quando o esporângio que recobre o endósporo de *P. penetrans* é rompido a adesão aumenta, pois as fibras parasporais são expostas (13). Vários fatores, como pH, sonicação de endósporos, temperatura, concentração de endósporos, tempo de exposição dos J2 aos endósporos, pré-tratamento de endósporos com detergentes, carboidratos, lectinas, pectinase, proteinase, quimiotripsina, lipase e ácido salicílico, podem afetar a adesão de endósporos de *P. penetrans* à cutícula de *Meloidogyne* spp. (3, 4, 10, 12, 13).

Rizobactérias são bactérias que habitam o solo ao redor das raízes e induzem plantas hospedeiras a se tomarem resistentes aos nematóides. Como *P. penetrans* e rizobactérias convivem no mesmo ambiente e podem ser usadas em conjunto no controle biológico do nematóide das galhas, objetivou-se neste trabalho estudar o efeito de dois isolados de rizobactérias, caracterizados anteriormente como eficientes na redução populacional de *Meloidogyne* spp. (1) na adesão de endósporos de *P. penetrans* a *M. javanica*.

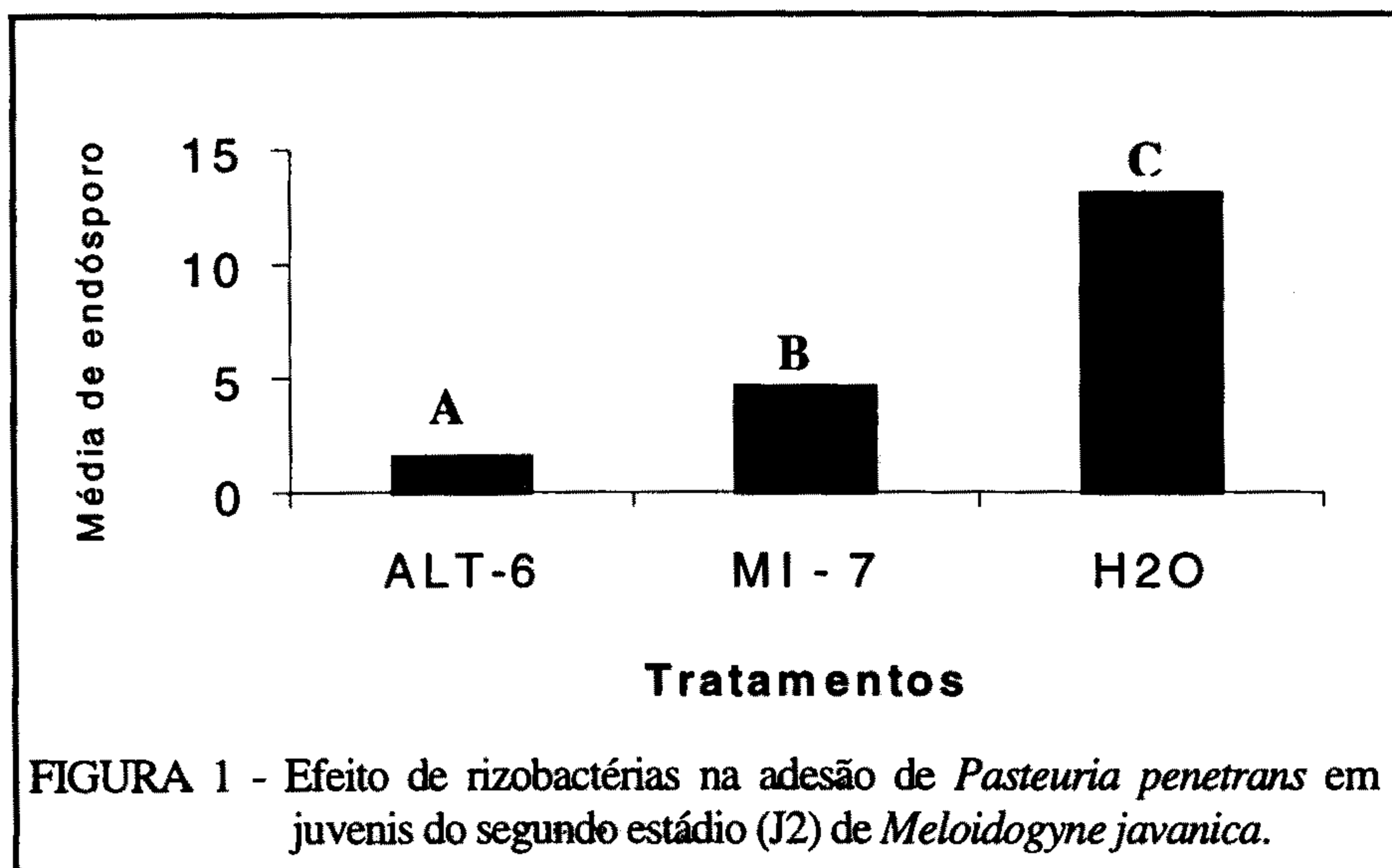
**Material e métodos.** Os isolados rizobacterianos foram obtidos por Almeida e colaboradores (1) ao realizarem, em casa de vegetação, uma seleção massal de 298 rizobactérias antagonistas a *M. javanica*. Os isolados MI-7 e ALT-6 destacaram-se dos demais ao apresentarem maiores reduções de galhas (44 e 60%), portanto, decidiu-se utilizá-los neste trabalho. Estes isolados foram repicados para novas placas em meio 523 de Kado e Heskett (9) e, após 48 horas de incubação a 28°C, foram colocados 10 mL de solução salina (0,85% de NaCl), obtendo-se uma suspensão de células bacterianas que, em espectrofotômetro, foi ajustada para  $A_{540}=0,8$ . Ovos de *M. javanica* mantidos em tomateiros em casa de vegetação, foram extraídos de raízes com galhas de tomateiro, por meio da dissolução das massas de ovos em NaOCl 0,5% (8), quantificados em câmara de Peters e colocados em câmara de eclosão para obtenção dos

juvenis de segundo estágio (J2), em temperatura ambiente. Utilizaram-se nos ensaios os J2 obtidos até o quarto dia da eclosão.

Endósporos de *P. penetrans* foram obtidos de fêmeas de *M. javanica* parasitando raízes de tomateiros cultivados em vasos em casa de vegetação (14). Fêmeas do nematóide foram retiradas das raízes com o auxílio de estilete, esmagadas em 2 mL de água destilada em tubo de vidro previamente lavado com leite desnatado e enxaguado com água destilada. A suspensão de endósporos foi quantificada em câmara de Neubauer, calibrando-se a suspensão para  $2,15 \times 10^6$  endósporos por tubo e a seguir centrifugada a 1850 G (3200 rpm) durante 10 minutos para obtenção do pelete de endósporos que foi utilizado nos ensaios.

Os endósporos no pelete formado foram ressuspensos em 10 mL de suspensão bacteriana dos isolados MI-7 ou ALT-6, ou em água destilada e incubados por 5 dias em 27 °C. A seguir, 200 J2 de *M. javanica* em 1 mL de água destilada foram colocados em cada tubo e realizada centrifugação a 400 G (1500 rpm) durante 20 minutos, para promover o contato dos endósporos com ao J2 e possível adesão. Cada tratamento constou de quatro repetições e, de cada repetição, 20 J2 foram escolhidos ao acaso e avaliados quanto ao número de endósporos aderidos/J2 com o auxílio de microscópio de objetiva invertida no aumento de 250 X. Utilizou-se o teste de Duncan para a comparação de médias de tratamento.

**Resultados e discussão.** Os isolados ALT-7 e MI-6 diminuíram a adesão de endósporos de *P. penetrans* ( $P \geq 0,05$ ) (Figura 1), apresentando



reduções de 91,5 e 51,6% do número de endósporos aderidos aos J2, quando comparados com o número de endósporos aderidos em J2 incubados em água (testemunha). Resultados semelhantes foram encontrados por Maximiliano et al. (10), os quais verificaram que filtrados obtidos dos isolados rizobacterianos ALF 166, ALF 132, TOM 163 e ALF 124 reduziram a adesão de endósporos de *P. penetrans* à cutícula de juvenis de *M. javanica*. De acordo com Davies e Danks (3), carboidratos na superfície da cutícula do nematóide interagem com moléculas de N-acetilglucosamina na superfície dos endósporos de *P. penetrans* que, por sua vez, estão ligadas a proteínas ou peptidoglicanos, que são extensões da parede celular da bactéria. Além disso, Davies et al. (7) destacam a importância de fibronectin, uma glicoproteína, na adesão de endósporos. Dessa forma, a redução na adesão de endósporos de *P. penetrans* à cutícula dos nematóides pode ser devida à degradação ou alteração de substâncias relacionadas ao reconhecimento entre os endósporos e a cutícula do nematóide, como fibras parasporais ou carboidratos do exósporo, além das substâncias já citadas, através de compostos produzidos no meio pelas rizobactérias (10). Até mesmo as células de rizobactérias entre os endósporos e os J2 na suspensão aquosa podem ter servido como barreira física à adesão.

## REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, A.M.S.; FREITAS, L.G.; ROMEIRO, R.S.; LANA, C.N. & NICOLI FILHO, N. Avaliação de rizobactérias para o controle do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. Fitopatologia Brasileira, 24 (Suplemento): 343, 1999.
2. CHEN, Z. X. & DICKSON, D.W. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. Journal of Nematology, 30:313-40, 1998.
3. DAVIES, K.G. & DANKS, C. Carbohydrate, proteins interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. Nematologica, 39:53-64, 1993.
4. DAVIES, K.D.; KERRY, B.R. & FLYNN, A.C. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. Annals Applied Biology, 112:491-501, 1988.
5. DAVIES, K.G.; LAIR, V. & KERRY, B.R. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with endospores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. Revue de Nematologie, 14:611-8, 1991.
6. DAVIES, K.G.; LEIJ, DE F.A.A.M & KERRY, B.R.. Microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes in tropical agriculture. Tropical Pest Management, 37:303-20, 1991.
7. 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, 112:553-9, 1996.
8. HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter, 57:1025-8, 1973.

9. KADO, C.I & HESKETT, M.S. Seletive media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60:969-76, 1970.
10. MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M. de & ALMEIDA, A.R. de. Efeito do pH e filtrados bacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira*, 25:21-6, 2001.
11. SAYRE, R.M. & WERGIN, W.P. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology*, 129:1091-101, 1977.
12. SPIEGEL, Y.; MOR, M. & SHARON, E. Attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to the surface of *Meloidogyne javanica* second-stage juveniles. *Journal of Nematology*, 28: 328-34, 1996.
13. STIRLING, G.R.; BIRD, A.F. & CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nematologie*, 9:251-60, 1986.
14. STIRLING, G.R. & WACHTEL, M.F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26:308-12, 1980.