

ADRIANA KISTER RODRIGUES

**Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em
Meloidogyne spp. Parasitando Diferentes Espécies
Vegetais**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

ADRIANA KISTER RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO DE *PASTEURIA PENETRANS* EM
MELOIDOGYNE SPP. PARASITANDO DIFERENTES
ESPÉCIES VEGETAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

ADRIANA KISTER RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO DE *PASTEURIA PENETRANS* EM
MELOIDOGYNE SPP. PARASITANDO DIFERENTES
ESPÉCIES VEGETAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

Aprovada: 03 de agosto de 2001

Prof. Aristéa Alves Azevedo
(Conselheira)

Prof. Silamar Ferraz

Prof. Onkar Dev Dhingra

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

Aos meus queridos pais.

*Pelos valiosos ensinamentos, amor, carinho, amizade, educação e motivação nos
momentos difíceis.*

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos valiosos ensinamentos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Leandro Grassi de Freitas, pela orientação durante o curso, por acreditar no meu trabalho, e principalmente pela amizade.

À professora Aristéa Alves Azevedo, pelos ensinamentos e orientação durante a condução dos trabalhos de histologia, e principalmente pela amizade e carinho.

Ao professor Murilo Geraldo de Carvalho pelas sugestões nas correções de português, e pela amizade.

Ao professor Onkar Dev Dhingra, pelos ensinamentos e sugestões de correções.

Aos professores Silamar Ferraz e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pelas sugestões e valiosos conselhos na condução do experimento.

Aos colegas Marcelo Penalva, Marcelo Laia, Clévio, Raquel, Ernesto, Nelson, Patrícia e José Marcelo, pelos grupos de estudo, trabalhos e principalmente pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides.

A Zilda Alzira Soares e Rosane Cruz Portugal, funcionárias do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela amizade, apoio e cooperação durante a condução dos trabalhos de histologia.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Carlos Alexandre, Sandra, Ruth, Carlos André, Carla, Tatiana e Silvana, pelo companheirismo e agradável convívio durante a condução dos nossos trabalhos.

Ao amigo Bruno, pelo apoio e principalmente pela amizade.

Às melhores amigas, Waneska e Viviane, pelos momentos de estudo, festas, companheirismo, carinho, e principalmente, apoio nos momentos difíceis de nossas vidas.

Ao Cacio, mesmo que na reta final deste trabalho, pelo apoio, carinho e companheirismo.

Ao meu estagiário “involuntário” Guilherme, pela ajuda indispensável na condução dos experimentos, e principalmente pela amizade e carinho. Um verdadeiro irmão!

À minha segunda família, Ronaldo, Efigênia e Carol, pela amizade e tardes agradáveis nos fins de semana.

Aos demais amigos e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
LITERATURA CITADA.....	10
CAPÍTULO 1	
TÉCNICAS DE COLORAÇÃO PARA DIFERENCIAÇÃO DE <i>PASTEURIA</i>	
<i>PENETRANS</i> E <i>MELOIDOGYNE</i> SPP. EM RAÍZES DE TOMATEIRO	
RESUMO.....	16
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
LITERATURA CITADA.....	23
CAPÍTULO 2	
DESENVOLVIMENTO DE <i>PASTEURIA PENETRANS</i> EM <i>MELOIDOGYNE</i>	
SPP. PARASITANDO DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS	
RESUMO.....	24
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1. Efeito da espécie de <i>Meloidogyne</i> e da planta hospedeira na maturação de <i>P.</i>	
<i>penetrans</i>	27
2. Ciclo de vida de <i>P. penetrans</i> em diferentes espécies hospedeiras de	
<i>Meloidogyne</i>	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31

1. Efeito da espécie de <i>Meloidogyne</i> e da planta hospedeira na maturação de <i>P. penetrans</i>	31
2. Ciclo de vida de <i>P. penetrans</i> em diferentes espécies hospedeiras de <i>Meloidogyne</i>	37
LITERATURA CITADA.....	43
CAPÍTULO 3	
EFEITO DO CORTE DA PARTE AÉREA DA PLANTA HOSPEDEIRA DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP. SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE <i>PASTEURIA PENETRANS</i>	
RESUMO.....	47
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
LITERATURA CITADA.....	59
CONCLUSÃO GERAL.....	61
LITERATURA CITADA.....	63

RESUMO

RODRIGUES, Adriana Kister, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001.

Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies vegetais. Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Conselheiros: Aristéa Alves Azevedo e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.

A bactéria *Pasteuria penetrans* é um parasita obrigatório do nematóide das galhas que atua prevenindo a produção de ovos pela fêmea e reduzindo a penetração dos juvenis nas raízes. Ela também produz esporos que persistem por anos no solo, e devido à sua eficiência e rusticidade, é considerada um ótimo agente de controle biológico. Sua produção *in vitro* ainda é inviável e a produção de inóculo requer o seu cultivo *in vivo* em nematóides parasitando plantas em vasos. Neste trabalho, buscou-se, mediante análise da bactéria no conteúdo do corpo da fêmea de nematóide parasitada, averiguar diferenças no desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), maxixe (*Cucumis anguria*) e camapu (*Physalis angulata*), e, por meio do estudo, histopatológico de raízes as possíveis razões para estas diferenças, como forma e tamanho de células gigantes. O esporângio que envolve o esporo prejudica a sua adesão à cutícula do nematóide, sendo antes conveniente utilizar algumas técnicas para sua ruptura. Testou-se a promoção de estresse ao nematóide hospedeiro através do corte da parte aérea de quatro espécies vegetais hospedeiras do nematóide e da suspensão da irrigação destas plantas para promover a ruptura dos esporângios e acelerar o aparecimento de esporos completamente maduros no interior da fêmea.

Para o estudo histopatológico, foram testadas técnicas de coloração conhecidas e introduzidas adaptações que facilitassem as observações microscópicas: 1) azul de astra e fucsina básica, 2) safranina, hematoxilina e orange G com adição de ácido tânico e cloreto férrico, e 3) coloração quádrupla-triarca. Nas duas primeiras técnicas foi difícil distinguir colônias bacterianas das estruturas internas do nematóide. Na terceira técnica,

as colônias bacterianas, o conteúdo do corpo do nematóide e as células vegetais, alteradas ou não pelo nematóide, apresentaram cores distintas. Desta forma, com a coloração quádrupla-triarca foi possível observar melhor as interações *Pasteuria-Meloidogyne*-planta hospedeira.

Dentre as espécies vegetais estudadas, o maxixe foi considerado o pior hospedeiro para a produção de inóculo pois nele se encontraram células gigantes anormais e prolongou o ciclo de vida da bactéria. A anatomia de células gigantes, considerada de aspecto normal, assim como o desenvolvimento da bactéria, foram semelhantes no camapu e no tomateiro, entretanto o ciclo de vida de *P. penetrans* foi ligeiramente mais curto em tomate. O corte da parte aérea e suspensão da irrigação aceleraram o amadurecimento dos esporos de *P. penetrans* em todas as plantas, o tabaco e o tomateiro se destacaram como os melhores hospedeiros para este fim.

ABSTRACT

RODRIGUES, Adriana Kister, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2001.

Development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne* spp. parasitizing different host plant species. Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Committee members: Aristéa Alves Azevedo and Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.

Pasteuria penetrans is an obligate parasite of root-knot nematodes preventing egg production by the female and reducing root penetration by the juvenile. Its spores persist for many years in the soil, and due to efficacy and rusticity it is considered an excellent biocontrol agent. The *in vitro* bacterial cultivation is not feasible yet, requiring *in vivo* inoculum production in nematode-parasitized potted plants. In this work, differences in the development of *P. penetrans* in *Meloidogyne* spp. parasitizing roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), gherkin (*Cucumis anguria*) and camapu (*Physalis angulata*), were evaluated by observing the body contents of the parasitized nematode females. Possible reasons for these differences, such as changes in the giant cell morphology, were analysed by histopathology of infected roots. The sporangial wall around the spore impairs its adhesion to the nematode cuticle, therefore it is convenient to use some technique to disrupt it. Stress induction in its host plant through removal of the aerial part and suspension of irrigation were tested to promote rupturing of the sporangium and accelerate the spore development inside the female.

Three histological staining techniques were compared for obtaining best contrast in the microscopic observations: 1) the astra blue plus basic fuchsin, 2) safranin, hematoxylin and orange G, with addition of tannic acid and iron chloride, and 3) the triarch quadruple stain. The former two staining techniques did not permit distinctions of bacterial colonies from the internal structures of the nematode, in the third technique the colors were clearly distinct among bacterial colonies, nematode body contents and the plant cells, whether or not altered by the nematode. Therefore, the triarch quadruple staining should be adopted for histopathological studies involving *P. penetrans*.

Gherkin was considered the worst among the tested hosts for inoculum production because it presented abnormal giant cells and delayed the bacterial life cycle. The giant cells anatomy and the bacterium development were similar in tomato and camapu root systems, but the *P. penetrans* life cycle was slightly shorter in tomato than in gherkin. Removal of the aerial part and suppression of irrigation accelerated the maturing of *P. penetrans* spores in all the plant species evaluated, with tobacco and tomato providing better results than gherkin.

INTRODUÇÃO GERAL

Nematóides fitoparasitas causam perdas de produção de 12% em média. O nematóide das galhas, gênero *Meloidogyne*, é considerado o mais importante dos nematóides fitoparasitas (Sasser & Freckman, 1987) pois sua extensa gama de hospedeiros inclui mono e dicotiledôneas, e plantas herbáceas e lenhosas (Hussey, 1985). Apesar deste nematóide ser um fator limitante na produtividade agrícola, medidas de controle ainda são pouco eficientes e específicas. O uso de variedades resistentes é limitado devido à mistura de espécies no campo, e a aplicação de nematicidas é pouco utilizada pois são pouco efetivos, caros e muito tóxicos. O controle biológico possibilita o resgate do equilíbrio populacional de nematóides no ecossistema natural, a partir do uso de organismos antagonistas (Campos, 1992).

A bactéria *Pasteuria penetrans* que possui um grande potencial para o uso como agente de controle biológico; é parasita obrigatória de fitonematóides, principalmente do gênero *Meloidogyne* (Mankau, 1975; Stirling, 1984). Os seus efeitos não são tão rápidos como os apresentados pelos nematicidas, entretanto, o inóculo desta bactéria não precisa ser reaplicado a cada cultivo, tornando o seu uso mais econômico. O seu cultivo em meio de cultura ainda não é possível, sendo a sua produção realizada com o cultivo *in vivo* em nematóides das galhas parasitando tomateiros, em vasos em casa de vegetação (Stirling & Wachtel, 1980).

Para que a bactéria se desenvolva, é necessário a adesão de seus esporos maduros à cutícula dos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp. *Pasteuria penetrans* pode reproduzir-se mais rapidamente em espécies vegetais que permitam melhor multiplicação do nematóide das galhas. Diferenças na duração do ciclo de vida de *P. penetrans* em *Meloidogyne javanica* parasitando diferentes plantas hospedeiras já

foram observadas por Gomes (1999), portanto a espécie vegetal é importante para a produção de inóculo da bactéria *in vivo* para posterior aplicação no campo.

O juvenil de segundo estágio do nematóide das galhas penetra as raízes do hospedeiro e migra intercelularmente até atingir o cilindro vascular (Wyss et al., 1992), onde se desenvolve, induzindo a modificação das células do hospedeiro, formando um sítio de alimentação com várias células gigantes multinucleadas (Huang, 1985; Pedrosa et al., 1996). Estas células de alimentação são estruturas altamente especializadas, de alta atividade metabólica, com a função de fornecer nutrientes para o desenvolvimento e reprodução do nematóide (Hussey, 1985; Sijmons et al., 1994). O ciclo de vida de *P. penetrans* é sincronizado com o do seu nematóide hospedeiro dentro do sistema radicular (Dickson et al., 1994), assim, as células de alimentação atuam como células de transferência, metabolizando os fotossintatos do hospedeiro e os transferem para o nematóide parasitado (Pedrosa, et al., 1996). Estes fotossintatos talvez possuam os nutrientes necessários ao bom desenvolvimento da bactéria.

Na tentativa de entender por que algumas plantas hospedeiras de *Meloidogyne* spp. permitem a multiplicação da bactéria mais rapidamente e em maior quantidade, o presente trabalho teve como objetivo a observação do desenvolvimento de *P. penetrans* em *M. javanica* e em *M. incognita* em populações puras, ou em população mista de ambas, em diferentes espécies de plantas hospedeiras, do sítio de alimentação induzido pelos nematóides e da relação destes fatores com a produção e desenvolvimento de esporos de *P. penetrans*.

LITERATURA CITADA

- CAMPOS, V. P. 1992. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. In: MIRANDA, G. M. C. (ed). Informe Agropecuário. Belo Horizonte, EPAMIG, 16(172): 26-30.
- DICKSON, D. W.; M. OOSTENDORP; R. M. GIBLIN-DAVIS & D. J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D.; F. D. BENNETT & J. L. CAPINERA (eds). Pest management in the subtropics. Biological control: A Florida perspective. Andover, Intercept Ltd, p. 575-601.
- GOMES, C. B. ; L. G. FREITAS & L. G. O. TOMÉ. 1999. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras conduzidas em dois tipos de vasos. Fitopatologia Brasileira, 24(Suplemento): 345(Resumo).

- HUANG, C. S. 1985. Formation, anatomy, and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In: SASSER, J. N. & C. C. CARTER (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. I: Biology and control. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 155-164.
- HUSSEY, R. S. 1985. Host-parasite relationship and associated physiological changes. In: SASSER, J. N. & C. C. CARTER (eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, vol. I: Biology and Control. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 143-153.
- MANKAU, R. 1975. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology, 26: 333-339.
- SASSER, J. N. & D. W. FRECKMAN. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A. & D. W. DICKSON (eds). Vistas on Nematology. Maryland, Society of Nematologists Inc., p. 7-14.
- SIJMONS, P. C.; H. J. ATKINSON & U. WYSS. 1994. Parasitic strategies of root-knot nematodes and associate host cell responses. Annual Review of Phytopathology, 32: 235-259.
- STIRLING, G. R. & M. F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. Nematologica, 26: 308-312.
- STIRLING, G. R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. Phytopathology, 74: 55-60.
- PEDROSA, E. M. R.; R. S. HUSSEY & H. R. BOERMA. 1996. Cellular responses of resistant and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. Journal of Nematology, 28(2): 225-232.
- WYSS, U.; F. M. W. GRUNDLER & A. MUNCH. 1992. The parasitic behaviour of second-stage of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. Nematologica, 38: 98-111.

REVISÃO DE LITERATURA

Nematóides fitoparasitas causam perdas de produção de 12% em média, sendo aproximadamente 9% em países desenvolvidos e 15% nos países em desenvolvimento. As perdas excedem 21% em tomate, 15% em café e 14% em citrus (Sasser & Freckman, 1987). São estimadas perdas monetárias de 77 bilhões de dólares por ano devido a nematóides em 21 principais culturas, das quais, 15 são de subsistência. Caso todas as culturas sejam consideradas, a estimativa excede 100 bilhões de dólares anualmente (Sasser & Freckman, 1987).

O gênero *Meloidogyne* é considerado o mais importante dos nematóides fitoparasitas (Sasser & Freckman, 1987) pois parasita mais de 2000 espécies de plantas. Sua extensa gama de hospedeiros inclui mono e dicotiledôneas, e plantas herbáceas e lenhosas (Hussey, 1985). Apesar deste nematóide ser um fator limitante na produtividade agrícola, medidas de controle ainda são pouco eficientes e específicas. Por exemplo, o uso de variedades resistentes é limitado devido à mistura de espécies no campo e à dificuldade de se encontrar fontes de resistência para todas as culturas, e a aplicação de nematicidas é pouco utilizada pois são pouco efetivos, caros e muito tóxicos. Como é difícil eliminar totalmente os nematóides de uma área infestada, a integração de técnicas de manejo é a forma viável para reduzir suas populações a níveis abaixo daqueles que possam reduzir a produtividade e trazer grandes prejuízos ao produtor, sem riscos de contaminação ao homem e ao meio ambiente. A prática do controle biológico insere-se perfeitamente dentro desta filosofia, tendo como base o uso de organismos antagonistas para se resgatar o equilíbrio populacional de nematóides no ecossistema natural, em inteira consonância com os demais organismos (Campos, 1992).

Microrganismos de ocorrência natural no solo são responsáveis por inúmeros exemplos de controle biológico (Baker & Cook, 1974). Destes organismos, os mais estudados são os fungos e as bactérias, e destas, *Pasteuria penetrans* é considerada como a mais importante e promissora. *Pasteuria penetrans* Sayre & Starr é um parasita obrigatório de fitonematóides, com grande potencial para o uso como agente de controle biológico, principalmente do gênero *Meloidogyne* (Mankau, 1975; Stirling, 1984). Estudos recentes têm mostrado resultados bastante animadores com o uso de *P. penetrans* como agente de biocontrole de fitonematóides, destacando o seu modo de ação, que consiste em inibir a produção de ovos pela fêmea e reduzir a penetração dos juvenis nas raízes. Este organismo é muito resistente às intempéries, como altas temperaturas e seca, persistindo por anos no solo (Campos, 1992), é inócuo ao homem e a outros animais, além de ser compatível com outras práticas de manejo (Mankau, 1980; Sayre & Starr, 1988), de fácil disseminação e ampla distribuição, efetivo e pode ser armazenado por longos períodos na forma de inóculo de pó de raiz. Tudo isto faz com que o uso deste organismo seja muito desejado. Apesar dos seus efeitos não serem tão rápidos, o inóculo desta bactéria não tem que ser reaplicado a cada cultivo, tornando o seu uso mais econômico. Muitos campos onde a produção agrícola já foi limitada por nematóides das galhas encontram-se supressivos em função da presença da bactéria (Mankau, 1980; Stirling, 1981; Ciancio et al., 1991). Entretanto, o seu cultivo em meio de cultura ainda não é possível, sendo a sua produção realizada em casa de vegetação para aplicação em áreas de cultivos de grande valor econômico (como olerícolas, ornamentais e medicinais), em cultivo protegido (estufas) ou de forma inoculativa em áreas com solo arenoso e irrigadas, onde o nematóide geralmente alcança altos índices populacionais.

Pasteuria spp. foi relatada pela primeira vez parasitando um nematóide por Cobb em 1906, que a classificou como um esporozoário. Em 1940, Thorne também a classificou como protozoário, descrevendo-a como *Duboscqia penetrans*; no entanto, estudos ultraestruturais em microscopia eletrônica, levaram Mankau (1975) a reclassificá-la como um procarioto, mais precisamente, como um membro do gênero *Bacillus* (Sturhan, 1985). A redescoberta de *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888 por Sayre et al. (1977) e suas similaridades morfológicas com *Bacillus penetrans*, sugeriram que estas duas bactérias tivessem um relacionamento genérico em comum. Em 1985, Sayre e Starr, designaram o organismo que parasitava *Meloidogyne incognita* como *Pasteuria penetrans*. O termo *P. penetrans* é empregado na bibliografia para designar a bactéria com esporângio na forma de tigela invertida e esporos elipsoidais, parasitas do

nematóide das galhas, gênero *Meloidogyne*, e não apenas de *M. incognita*, a espécie de onde foi retirado o isolado descrito primeiramente como *Pasteuria penetrans* (Stirling et al., 1990; Hatz & Dickson, 1992; Chen et al., 1994; Weibelzahl-Fulton et al., 1996; Chen et al., 1997). Portanto, *P. penetrans* deve ser empregado com o significado de “membros do grupo *P. penetrans*” (Sayre & Starr, 1985; Sayre & Starr, 1988). Estudos moleculares mostraram um relacionamento entre o gênero *Pasteuria* e membros dos grupos *Clostridium*, *Bacillus* e *Streptococcus*, bactérias gram-positivas, e não muito relacionadas com actinomicetes formadores de esporos (Atibalentja et al., 2000).

O ciclo de vida desta bactéria começa com o encontro e adesão de seus esporos ao juvenil de segundo estágio de *Meloidogyne* spp. (J2) quando este se movimenta no solo à procura de raízes de plantas hospedeiras. Após a penetração do J2 na raiz e estabelecimento de seu sítio de alimentação, cada esporo de *P. penetrans* emite um tubo germinativo que perfura a cutícula, hipoderme e células musculares, atingindo o pseudoceloma onde forma microcolônias vegetativas (Fase I), na forma de couve-flor, que proliferam pelo corpo do nematóide. Posteriormente, as microcolônias se fragmentam (Fase II) e ocorre a esporulação (Fase III), com a produção de aproximadamente dois milhões de esporos por fêmea (Bird, 1986; Dickson et al., 1994), os quais podem preencher completamente o corpo do nematóide (Figura 1). Os esporos são liberados após a morte e decomposição da fêmea do nematóide e se dispersam primariamente por percolação da água e por movimentação do solo (Sturhan, 1985), permanecendo viáveis no solo por muitos anos. Eles são resistentes à dessecação (Stirling, 1984) e suportam bem temperaturas elevadas. O ciclo de vida da *Pasteuria* é sincronizado com o do seu hospedeiro dentro do sistema radicular e sob condições ótimas de temperatura (cerca de 30°C) ele se completa em aproximadamente 30 dias (Dickson et al., 1994). Não ocorre desenvolvimento da bactéria abaixo de 17°C (Chen & Dickson, 1997). A adesão dos esporos, desenvolvimento e reprodução de *P. penetrans* infectando juvenis de *M. javanica* e *M. arenaria* aumentam com o aumento de temperatura entre a faixa de 20 e 30 °C (Stirling, 1981; Stirling et al., 1990; Hatz & Dickson, 1992).

Os nematóides hospedeiros de *Pasteuria* spp. incluem aproximadamente 323 espécies de nematóides, em cerca de 116 gêneros (Chen & Dickson, 1998). Estes nematóides apresentam hábitos alimentares diferentes e ciclos de vida que variam em duração, apresentando fisiologia distinta em cada espécie. A pressão de seleção favorece a bactéria cuja fisiologia se assemelha à do seu nematóide hospedeiro. O

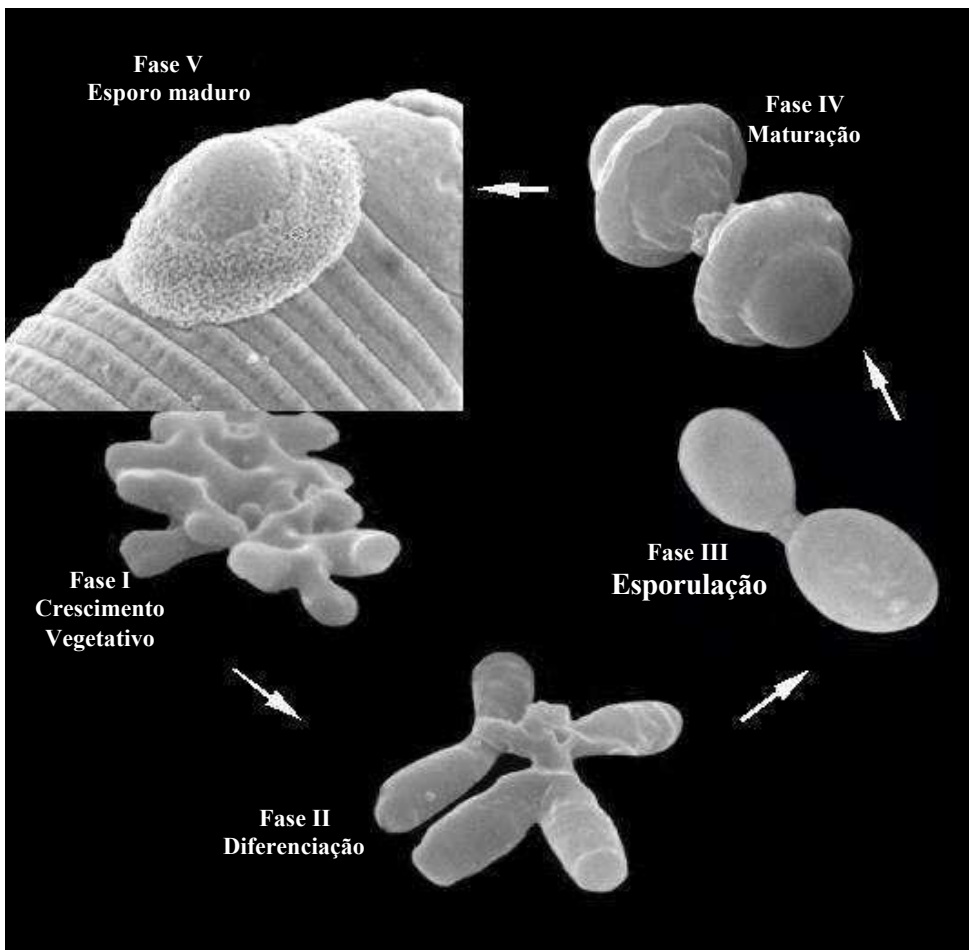


Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura das fases do ciclo de vida de *Pasteuria penetrans*.

relacionamento íntimo que existe entre estas bactérias e seus hospedeiros sugere que o gênero *Pasteuria* contenha várias espécies (Sayre et al., 1991). Populações de campo de *P. penetrans* são geneticamente heterogêneas, e a seleção ocorre quando alguns esporos que se aderem melhor a uma determinada população do nematóide, resultam na produção de muitos esporos, que predominarão na próxima geração deste isolado (Channer & Gowen, 1992). Subpopulações de esporos aderem-se em maior quantidade às populações de nematóides onde foram multiplicadas (Davies et al., 1994), porém, isolados de *P. penetrans* podem aderir-se a diferentes populações, espécies e até mesmo gêneros de nematóides (Dickson et al., 1994). A especificidade quanto ao nematóide hospedeiro varia entre populações ou isolados de *P. penetrans* e, provavelmente, é resultado de diferenças em quantidade e tipos de proteínas na superfície dos esporos (Davies et al., 1992). Segundo Davies & Danks (1993), carboidratos presentes na superfície da cutícula do nematóide interagem com moléculas de N-acetylglucosamina presentes na superfície dos esporos de *P. penetrans*, que por sua vez, estão ligadas às

proteínas ou peptidoglicanos, que são extensões da parede celular da bactéria. A adesão de esporos de *P. penetrans* a determinadas populações de nematóides das galhas e não a outras tem grande importância para o uso como agente de controle biológico (Freitas & Carneiro, 2000). De acordo com Stirling (1985), o isolado de *P. penetrans* a ser usado para o controle de determinada população de nematóide das galhas, deve ser escolhido de acordo com sua adesão ao nematóide em questão, dando preferência a isolados com ampla gama de hospedeiros, uma vez que populações mistas de nematóides das galhas ocorrem naturalmente no campo.

Tem sido difícil determinar a extensão do papel de *P. penetrans* na supressão de doenças causadas por nematóides, pois esta bactéria ainda não foi cultivada em meio de cultura. A supressividade de um solo ocorre quando na presença do patógeno, a doença não se manifesta ou não é severa (Hornsby, 1983). Stirling (1984) determinou que *P. penetrans* era a responsável pelo declínio de nematóides das galhas em campos de cultivo de uva no sul da Austrália. O autor adicionou nematóides em vasos com solo de campo, em estado natural ou autoclavado, e observou que o nematóide se multiplicou muito mais em solo autoclavado do que em solo natural, e que a autoclavagem inativou *P. penetrans*. Chen (1994) determinou que autoclavando solo por 4 minutos/kg de solo, elimina a maioria dos fungos de solo, mas não *P. penetrans*; mostrando a utilidade da técnica na separação dos efeitos de fungos nematófagos e *P. penetrans* no controle de nematóides. Um isolado de *P. penetrans*, obtido em uma fazenda de produção de amendoim, foi introduzido em solo não supressivo ao nematóide das galhas na Fazenda Experimental da Universidade da Flórida no verão de 1987, para estudos de microparcelas, verificando-se que ao final de três anos, o solo tornou-se supressivo a este nematóide (Oostendorp et al., 1991). *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 1, também tiveram seu desenvolvimento inibido num campo de fumo, a 300m de distância da área em que o isolado foi introduzido, sugerindo assim ser a bactéria *P. penetrans* a causa primária da supressão de ambos nematóides (Chen, 1994; Weibelzahl-Fulton et al., 1996).

A distribuição e o número de esporos de *P. penetrans* no solo, a atividade e a idade do nematóide alvo, o regime de irrigação que favoreça maior reprodução do nematóide e, portanto, da bactéria são considerados fatores importantes no sucesso do controle biológico de *Meloidogyne* spp. (Davies et al., 1991). Esporos aderidos ao nematóide podem evitar que ele penetre no sistema radicular do hospedeiro. Segundo Mankau & Prasad (1977), juvenis de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* têm seu movimento comprometido quando mais de três esporos encontram-se aderidos à

cutícula. Redução significativa na penetração de raízes de tomateiro por juvenis de *M. incognita* infectados por *P. penetrans* foi observado por Brown & Smart (1985) quando os J2 tinham, em média, 15 esporos aderidos à cutícula. Portanto, um dos fatores mais importantes a serem considerados neste método de controle é o número de esporos aderidos ao nematóide (Rao et al., 1997). Não há dados concretos do papel desta variável sobre a redução da penetração e a reprodução do nematóide. Davies et al. (1988) reportaram que a invasão das raízes de tomateiro por *Meloidogyne* foi reduzida em aproximadamente 86% quando os juvenis foram inoculados no solo em alta densidade populacional (1.000 ou 3.000 juvenis/planta) veiculando quinze ou mais esporos. Stirling (1984) considerou necessária a adesão de mais de cinco esporos por nematóide para assegurar 90% de fêmeas infectadas. No trabalho realizado por Rao et al. (1997), 64% das fêmeas apresentavam-se infectadas quando oito a doze esporos eram aderidos ao juvenil. Entretanto, sem a sua produção em meio de cultura, o uso como nematicida biológico é limitado, mas a associação deste organismo, em manejo integrado de nematóides, faz com que sua ação se potencialize com o tempo, até que o solo se torne supressivo.

Algumas espécies vegetais, como *Lycopersicon esculentum* (Bird, 1959, 1986; Starr, 1993), *Lactuca sativa* e *Vicia faba* (Starr, 1993), *Nicotiana tabacum* e *Physalis* sp. (Gomes et al., 1999) permitem estabelecer melhor desenvolvimento e maior reprodução de *Meloidogyne*. Este se desenvolve em diferentes velocidades dependendo da temperatura (Bird, 1986). Se esta estiver próxima do ótimo (30 °C), acarreta um melhor desenvolvimento e maior produção de esporos de *P. penetrans* (Stirling, 1981) nos nematóides parasitas destas plantas.

As investigações da histologia, citoquímica e ultra-estrutura do sítio de alimentação e do tecido radicular adjacente têm contribuído para aprofundar os conhecimentos na dinâmica da interação entre planta hospedeira e nematóide parasita. Tais estudos encontram-se revisados para nematóides formadores de galhas e demais endoparasitas (Dropkin, 1969; Bird, 1974; Endo, 1975). No Brasil, estudos histopatológicos de nematóides parasitas de plantas são escassos, reportando-se principalmente ao gênero *Meloidogyne* (Mendes et al., 1977, 1978). Em estudos de histopatologia, realizados por Fawole (1988), os resultados da infecção artificial de *Meloidogyne incognita* em inhame e tomateiro indicam que o juvenil se move intercelularmente, alcançando o cilindro vascular e estabelecendo sítios de alimentação. Células gigantes na planta são induzidas pelo nematóide, possuem citoplasma denso e apresentam-se multinucleadas em inhame, enquanto que, em tomateiro, apenas um

núcleo é formado. Os ovos usualmente circundam o tecido necrosado, sendo as necroses associadas com massas gelatinosas. Juvenis são observados em células adjacentes circundando o tecido necrótico. Stender et al. (1986) observaram, em raízes de tomateiro, células gigantes típicas circundando a cabeça do nematóide *Meloidogyne javanica*, caracterizadas por denso citoplasma, muitos núcleos dilatados e nucléolos proeminentes, paredes celulares espessas e xilema deformado nas adjacências. Mojtahedi et al. (1988), estudando mudanças histológicas em alfafa (*Medicago sativa* cv. Thor) induzidas por diferentes raças de *M. chitwoodi* e *M. hapla*, mostraram que juvenis de segundo estágio (J2) de *M. chitwoodi* raça 1 ficam imobilizados no cilindro vascular e a região em torno do tecido, localizada ao redor do corpo do nematóide, ficou escurecida após ser corada com safranina, indicando mudanças na histoquímica do hospedeiro. A alteração da cor dos tecidos de raízes é comum quando estas são invadidas por *M. chitwoodi* raças 1 e 2, mas não em raízes invadidas por *M. hapla*. Alguns J2 de *M. chitwoodi* raça 1 iniciam a formação de pequenas células gigantes, com produção de poucos ovos.

Cada planta hospedeira, resistente ou suscetível, resulta numa série de eventos, que são facilmente divididos em estádios pré e pós-infeccionais. Tais eventos podem ou não levar ao estabelecimento da doença. Resistência é a inibição ou ausência do desenvolvimento da doença na planta na presença do agente patogênico (Veech, 1981). Estudos indicam alfafa (*Medicago sativa* L.) como má hospedeira a *Meloidogyne* (O'Bannon et al., 1982), sendo recomendada em rotação de cultura para redução de populações de nematóides, pois este penetra no sistema radicular da planta, não é capaz de induzir a formação de células gigantes e morre, ou sai da raiz, após a penetração (Mojtahedi et al., 1988). Assim, uma forma de se avaliar o desenvolvimento insuficiente de *Meloidogyne* na planta hospedeira e, talvez uma forma de se detectar um hospedeiro inadequado para a produção de esporos de *Pasteuria penetrans* é a avaliação da capacidade do nematóide de induzir a formação de células gigantes.

LITERATURA CITADA

ATIBALENTJA, N; G. R. NOEL & L. L. DOMIER. 2000. 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*, 50(2): 605-613.

- BAKER, K. F. & R. J. COOK. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco, W. H. Freeman & Co, American Phytopathological Society.
- BIRD, A. F. 1959. Development of the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* (Treub) and *Meloidogyne hapla* Chitwood in the tomato. *Nematologica*, 4: 31-42.
- BIRD, A. F. 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annual Review of Phytopathology*, 12: 69-85.
- BIRD, A. F. 1986. The influence of the actinomycete, *Pasteuria penetrans*, on the host-parasite relationship of the plant-parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. *Parasitology*, 93: 571-580.
- BROWN, S. M. & G. C. SMART JR. 1985. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology*, 17: 123-126.
- CAMPOS, V. P. 1992. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. In: MIRANDA, G. M. C. (ed). *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, EPAMIG, 16(172): 26-30.
- CHANNER, A. G. de R. & S. R. GOWEN. 1992. Selection for increased host resistance and increased pathogen specificity in the *Meloidogyne-Pasteuria penetrans* interaction. *Fundamental and Applied Nematology*, 15:331-339.
- CHEN, S. 1994. Fungal antagonists of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. Ph. D. Dissertation. Gainesville, University of Florida, 169p.
- CHEN, Z. X.; D. W. DICKSON & E. B. WHITTY. 1994. Response of *Meloidogyne* spp. to *Pasteuria penetrans*, fungi, and cultural practices in tobacco. *Journal of Nematology*, 26(4S): 620-625 (Suplemento).
- CHEN, Z. X. & D. W. DICKSON. 1997. Minimal growth temperature of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 29(4S): 635-639 (Suplemento).
- CHEN, Z. X.; D. W. DICKSON; L.G. FREITAS & J. F. PRESTON. 1997. Ultrastructure, morphology, and sporogenesis of *Pasteuria penetrans*. *Phytopathology*, 87: 273-283.
- CHEN, Z. X. & D. W. DICKSON. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology*, 30: 313-340.
- CIANCIO, A.; R. MANKAU. & M. MUNDO-OCAMPO. 1991. Parasitism of *Helicotylenchus lobus* by *Pasteuria penetrans* in naturally infested soil. *Journal of Nematology*, 24(1): 29-35.
- DAVIES, K. G.; B. R. KERRY & C. A. FLYNN. 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*, 112: 491-501.

- DAVIES, K. G.; V. LAIRD & B. R. KERRY. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Revue de Nématologie*, 14: 611-618.
- DAVIES, K. G.; M. P. ROBINSON & V. LAIRD. 1992. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59: 18-23.
- DAVIES, K. G. & C. DANKS. 1993. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 39: 53-64.
- DAVIES, K. G.; M. REDDEN & K. PEARSON. 1994. Endospore heterogeneity in *Pasteuria penetrans* related to adhesion to plant-parasitic nematodes. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 370-373.
- DICKSON, D. W.; M. OOSTENDORP; R. M. GIBLIN-DAVIS & D. J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D.; F. D. BENNETT & J. L. CAPINERA (eds). *Pest management in the subtropics. Biological control: A Florida perspective*. London, Intercept Ltd, p.575-601.
- DROPKIN, V. H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other host resistant to *Meloidogyne* reversal by temperature. *Phytopathology*, 59(11): 1632-1637.
- ENDO, B. Y. 1975. Pathogenesis of nematode-infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 13: 213-238.
- FAWOLE, B. 1988. Histopathology of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection on white yam (*Dioscorea rotundata*) tubers. *Journal of Nematology*, 20(1): 23-28.
- FREITAS, L. G. & R. M. D. CARNEIRO. 2000. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* spp. In: MELO, I. S. & J. L. AZEVEDO (eds). *Controle Biológico*, vol. II. Jaguariúna, SP, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio Ambiente, p. 91-125.
- GOMES, C. B. ; L. G. FREITAS & L. G. O. TOMÉ. 1999. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras conduzidas em dois tipos de vasos. *Fitopatologia Brasileira*, 24(Suplemento): 345(Resumo).
- HATZ, B. & D. W. DICKSON. 1992. Effect of temperature on attachment, development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 24: 512-521.
- HORNSBY, D. 1983. Suppressing soils. *Annual Review of Phytopathology*, 21: 65-85.

- HUSSEY, R. S. 1985. Host-parasite relationship and associated physiological changes. In: SASSER, J. N. & C. C. CARTER (eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, vol. I: Biology and Control. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 143-153.
- MANKAU, R. 1975. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology, 26: 333-339.
- MANKAU, R. & D. N. PRASAD. 1977. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. Journal of Nematology, 9: 40-45.
- MANKAU, R. 1980. Biological control of nematodes pests by natural enemies. Annual Review of Phytopathology, 18: 415-440.
- MENDES, B. V.; S. FERRAZ & C. SHIMOYA. 1977. Observações histopatológicas de raízes de cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887. In: Reunião de Nematologia, 2. Piracicaba, Sociedade Brasileira de Nematologia, p.207-229.
- MENDES, B. V.; E. J. B. N. CARDOSO & E. R. FERNANDES. 1978. Histopatologia de raízes de feijoeiro parasitadas por *Meloidogyne javanica*. In: Reunião de Nematologia, 3. Mossoró, Sociedade Brasileira de Nematologia, p.109-115.
- MOJTAHEDI, H.; G. S. SANTO & J. N. PINKERTON. 1988. Differential response of Thor Alfalfa to *Meloidogyne chitwoodi* Races and *M. hapla*. Journal of Nematology, 20(3): 410-416.
- O'BANNON, J. H.; G. S. SANTO & A. P. NYEZAPIR. 1982. Host range of the Columbia root-knot nematode. Plant Disease, 66: 1045-1048.
- OOSTENDORP, M.; D. W. DICKSON & D. J. MITCHELL. 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology, 23: 58-64.
- RAO, M. S.; S. R. GOWEN; B. PEMBROKE & P. REDDY. 1997. Relationship of *Pasteuria penetrans* spores encumbrance on juveniles of *Meloidogyne incognita* and their infection in adults. Nematologia Brasileira, 25: 129-131.
- SASSER, J. N. & D. W. FRECKMAN. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH J. A. & D. W. DICKSON (eds). Vistas on Nematology. Maryland, Society of Nematologists, p. 7-14.
- SAYRE, R. M.; W. P. WERGIN & R. E. DAVIS. 1977. Occurrence in *Monia rectirostris* (Cladocera: Daphnidae) of a parasite morphologically similar to *Pasteuria ramosa* (Metchnikoff, 1888). Canadian Journal of Microbiology, 23: 1573-1579.

- SAYRE, R. M. & M. P. STARR. 1985. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. N., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 52: 149-165.
- SAYRE, R. M. & M. P. STARR. 1988. Bacterial disease and antagonism of nematodes. In: POINAR, G. O. & H. B. JANSSON (eds). Diseases of Nematodes, vol. I. Boca Raton, CRC Press, p. 69-101.
- SAYRE, R. M.; W. P. WERGIN; J. M. SCHMIDT & M. P. STARR. 1991. *Pasteuria nishizawae* sp. nov. a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. Research in Microbiology, 142: 551-564.
- STARR, J. L. 1993. Dynamics of the nuclear complement of giant cells induced by *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 25(3): 416-421.
- STENDER, C.; I. GLAZER & D. ORION. 1986. Effects of hydroxyurea on the ultrastructure of giant cells induced by *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology, 18(1): 37-43.
- STIRLING, G. R. 1981. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. Nematologica, 27: 458-462.
- STIRLING, G. R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. Phytopathology, 74: 55-60.
- STIRLING, G. R. 1985. Host specificity of *Meloidogyne javanica* within the genus *Meloidogyne*. Nematologica, 31: 203-209.
- STIRLING, G. R.; R. D. SHARMA & J. PERRY. 1990. Attachment of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects of the infectivity. Nematologica, 36: 246-252.
- STURHAN, D. 1985. Untersuchungen über Verbreitung und wirte des Nematodenparasiten *Bacillus penetrans*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, 226: 75-93.
- THORNE, G. 1940. *Dubosqia penetrans* n. sp. (Sporozoa: Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 7: 51-53.
- VEECH, J. A. 1981. Plant resistance to nematodes. In: ZUCKERMAN, B. M. & R. A. ROHDE (eds). Plant parasitic nematodes, vol. III. New York, Academic Press, p. 377-403.

WEIBELZAHN-FULTON, E.; D. W. DICKSON & E. B. WHITTY. 1996. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. *Journal of Nematology*, 28: 43-49.

CAPÍTULO 1

Técnicas de Coloração para Diferenciação de *Pasteuria penetrans* e *Meloidogyne* spp. em Raízes de Tomateiro¹

ADRIANA KISTER RODRIGUES^{2,4}, LEANDRO GRASSI DE FREITAS² & ARISTÉA ALVES AZEVEDO³

RESUMO

Rodrigues, A. K.; L. G. Freitas & A. A. Azevedo. 2000. Técnicas de coloração diferencial entre *Pasteuria penetrans* e *Meloidogyne* spp. em raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira.**

Para avaliar o desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando plantas de espécies hospedeiras diferentes e as alterações causadas pelo nematóide nas células destas plantas foram testadas técnicas de coloração conhecidas e introduzidas adaptações que facilitassem as observações microscópicas: 1) azul de astra e fucsina básica, 2) safranina, hematoxilina e orange G, com adição de ácido tânico e cloreto férrico, e 3) coloração quádrupla-triarca. Com as duas primeiras técnicas foi difícil distinguir colônias bacterianas das estruturas internas do nematóide. Na terceira, as colônias bacterianas, o conteúdo do corpo do nematóide e as células vegetais, alteradas ou não pelo nematóide, apresentaram cores distintas. Desta forma, a coloração quádrupla-triarca foi a mais indicada para estudos histológicos de interações *Pasteuria-Meloidogyne*-planta hospedeira.

Palavras-chave: *Meloidogyne*, *Pasteuria penetrans*, coloração, tomateiro.

SUMMARY

Rodrigues, A. K.; L. G. Freitas & A. A. Azevedo. 2000. Techniques of differential staining between *Pasteuria penetrans* and *Meloidogyne* spp. in tomato roots. **Nematologia Brasileira.**

To evaluate the development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne* spp. parasitizing distinct host plant species and the consequent histological changes in the plant cells, three staining techniques with modifications were compared in order to facilitate the microscopic observations: 1) astra blue and basic fuchsin stain, 2) safranin, hematoxylin and orange G, with addition of tannic acid and iron chloride, and 3) triarch quadruple stain. Bacterial colonies were indistinguishable from the internal structures of the nematode when using the first and second staining techniques, but colors were clearly distinct among bacterial colonies, nematode body contents and the plant cells, whether or not altered by the nematode, when the third stain technique was used. Therefore, the triarch quadruple staining should be adopted for histopathological studies involving *P. penetrans*.

Key Words: *Meloidogyne*, *Pasteuria penetrans*, coloration, tomato.

¹Parte da Dissertação de Mestrado em Fitopatologia do 1º autor desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa/UFV.

²Departamento de Fitopatologia e ³Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG, Brasil.

⁴Autor para correspondência: akister@bol.com.br

INTRODUÇÃO

Pasteuria penetrans (Thorne) Sayre & Starr é uma bactéria formadora de esporos, considerada um dos mais promissores agentes para controle biológico de nematóides do gênero *Meloidogyne*, popularmente conhecidos como os nematóides das galhas (Dickson et al., 1994; Stirling, 1984). Esta bactéria é parasita obrigatório de nematóides e como a sua produção por cultivo *in vitro* ainda não é satisfatória (Willians et al., 1989), a sua multiplicação para ser usada como inóculo no campo requer o cultivo *in vivo*, em nematóides parasitando plantas em vasos (Stirling & Wachtel, 1980).

Gomes et al. (1999) observaram que o número de esporos de *P. penetrans* produzidos por planta hospedeira e o número de dias que os esporos necessitam para ficarem maduros dependem da espécie vegetal utilizada como planta hospedeira. Para compreender melhor esses fatores observou-se em cortes histológicos o desenvolvimento da bactéria, do nematóide e a morfologia de células gigantes. Estas investigações requerem métodos de coloração que facilitem as observações (Daykin & Hussey, 1985), fornecendo mais detalhes e contraste de cores nos cortes histológicos. Em estudos histológicos de plantas, várias técnicas de coloração são usadas combinando-se, em geral, dois ou mais corantes: fucsina e azul de astra; safranina e fast green; hematoxilina e safranina; hematoxilina, safranina e orange G, dentre outras. O azul de astra apresenta afinidade por paredes celulares celulósicas e citoplasma; a fucsina básica tem afinidade por paredes celulares lignificadas, suberificadas e cutinizadas (Kraus & Arduin, 1997). O ácido tânico e o cloreto férrico reagem com a parede celulósica, aumentando o contraste de paredes finas; a safranina possui grande afinidade por paredes celulares lignificadas sendo também usada para corar proteínas, núcleos (Lillie, 1990) e paredes suberificadas; o fast green apresenta maior afinidade por paredes celulares celulósicas e citoplasma (Lillie, 1990); a hematoxilina é usada para colorações em geral (Lillie, 1990), cora parede celulósica, lamela média, plastídeos e núcleos; e o orange G que apresenta maior afinidade por componentes citoplasmáticos. A coloração quádrupla-triarca (Hagquist, 1974) tem sido usada para corar raízes com nematóides (Daykin & Hussey, 1985) e envolve a utilização de safranina, cristal violeta, orange G e fast green. O cristal violeta é usado para corar bactérias em técnicas de gram (Lillie, 1990) e também apresenta afinidade por paredes celulares lignificadas e cutinizadas (Kraus & Arduin, 1997), núcleos e plastídeos.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um método de coloração apropriado para a distinção dos esporos da bactéria *Pasteuria penetrans* e de seus estádios de desenvolvimento no interior do nematóide, e para a observação das alterações nas células da planta hospedeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), grupo Santa Cruz, para multiplicação de *Meloidogyne* spp. infectados por *Pasteuria penetrans*, em copos plásticos de 500ml com mistura solo e areia (1:2), previamente tratada com brometo de metila, e mantidas em câmara de crescimento a 26°C. O isolado de *P.*

penetrans foi multiplicado parasitando *M. javanica* em tomateiros mantidos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV. As raízes foram cuidadosamente lavadas em água corrente para que não ocorressem fermentos e desalojamento de fêmeas. Raízes com galhas foram seccionadas em pequenas amostras e fixadas em FAA₅₀ (Johansen, 1940) por 24 horas. Em seguida, iniciou-se o processo de desidratação etílica-butílica, utilizando-se a técnica de Johansen (1940). O corante eritrosina foi adicionado na primeira transferência para álcool etílico absoluto (AE) para que se pudesse visualizar o material após a inclusão em parafina. Na última transferência para álcool butílico terciário puro (TBA), após 40 minutos de permanência neste álcool, foi adicionado igual volume de parafina fundida, e se aguardou a temperatura ambiente por uma noite. No dia seguinte, este volume foi substituído por parafina pura e deixado em estufa a 68°C por 1 hora, com repetição da troca, e deixado por mais 1 hora na estufa. Em seguida, o material foi emblocado com o uso de formas apropriadas, em mistura de parafina (92%) + cera de abelha fundida (8%) e deixou-se esfriar sobre placa de gelo até solidificação do bloco. Os blocos solidificados foram armazenados em geladeira até a utilização.

Foram obtidos cortes transversais de raízes, com 12 a 15 µm de espessura, em micrótomo rotativo. Os cortes foram afixados às lâminas com adesivo de Haupt. Após secagem à temperatura ambiente, procedeu-se à desparafinização e coloração, conforme as técnicas descritas a seguir. Modificações de procedimento foram feitas quando os resultados de etapas das técnicas originais não foram satisfatórios.

A primeira técnica testada, utiliza azul de astra e fucsina básica (Roeser, 1972). Iniciou-se com a desparafinação dos cortes, colocando-se as lâminas em xileno durante 10 minutos por duas vezes, seguindo-se a passagem em xileno-etanol 3:1, 1:1, e 1:3 (v/v) (Johansen, 1940), por 10 minutos em cada solução. As lâminas contendo os cortes foram hidratadas em série etanólica decrescente (Johansen, 1940), deixando-se por 10 minutos em cada solução. Imergiram-se as lâminas em fucsina básica, por 24 horas, e azul de astra (Kropp, 1972), por 3 a 5 minutos. Após coloração, as lâminas foram desidratadas em série etanólica, em modificação da série isopropanólica, depois as passaram em etanol-xileno 3:1, 1:1 e 1:3 (v/v). Estas duas últimas etapas são de passagens rápidas para o material não perder a cor.

A segunda técnica de coloração testada utiliza safranina, hematoxilina e orange G (Foster, 1934), usando-se ácido tânico e cloreto férrico para acentuar o contraste da parede celular. Procedeu-se a desparafinação e hidratação, e após o uso de cloreto férrico a 3% e do ácido tânico a 1%, e lavagem em água, o material foi corado em

hematoxilina por 15 minutos, e lavado em água destilada por três vezes para remoção do excesso de corante. Passou-se em etanol 50% e corou-se com safranina 1% em etanol 50%, por 20 minutos. Após a desidratação em série etanólica crescente, procedeu-se à coloração com orange G, por 2 minutos, antes do etanol 100%.

A terceira técnica testada foi a coloração quádrupla-triarca, proposta por Hagquist, 1974 (Daykin & Hussey, 1985). Os cortes foram desparafinados e passados em xileno-etanol 100% 1:1 (v/v) por 5 a 10 minutos. Hidrataram-se e coraram-se os cortes com safranina O a 1% em etanol 50% por 15 a 25 minutos. Coraram-se em seguida, com cristal violeta 1%, por 2 a 5 minutos. A seguir, os cortes foram corados com orange G (135 ml) + fast green (15 ml), 3 a 8 minutos; orange G (145 ml) + fast green (5 ml), orange G (148 ml) + fast green (2 ml), e em orange G por 2 a 5 minutos.

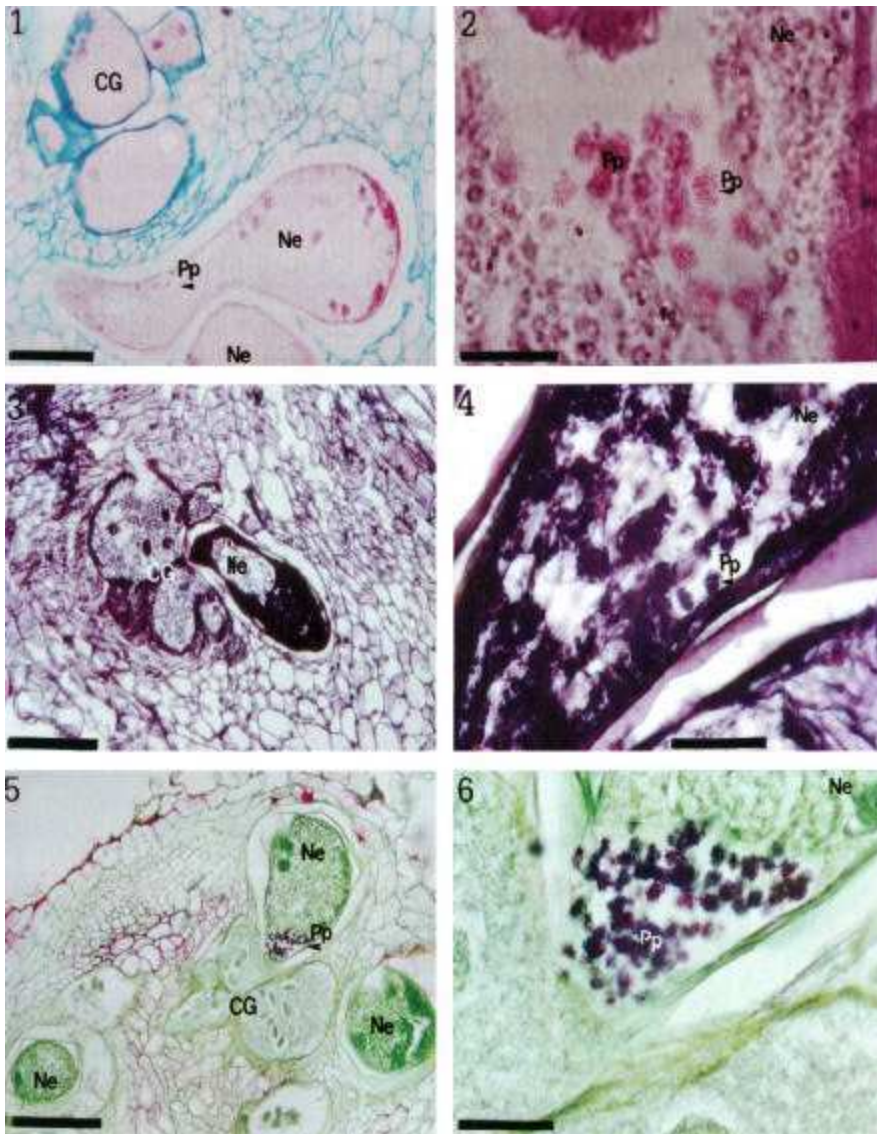
Os cortes prontos foram montados com bálsamo do Canadá, cobertos com lamínula e deixados para secar em estufa a 42°C. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Olympus AX 70, com sistema U-photo utilizando-se filme Kodak Gold 100 ASA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na coloração com azul de astra e fucsina básica e com safranina, hematoxilina e orange G, observou-se um escurecimento das colônias bacterianas quando comparado com o corpo do nematóide hospedeiro e células vegetais, sendo que, em ambas as técnicas a cor das estruturas bacterianas não diferiu da cor do conteúdo do corpo do nematóide hospedeiro (Figuras 1, 2, 3 e 4). A fucsina tem afinidade por paredes celulares lignificadas e suberificadas, e no caso do material em estudo foram necessárias 24 horas para coloração das estruturas, em modificação dos 15 min. proposto Roeser (1972), pois com menos de 24 h, as estruturas não ficam coradas de maneira adequada. O corante evidenciou o citoplasma, os núcleos de células gigantes, todo o corpo do nematóide, e também colônias bacterianas. O azul de astra apresenta afinidade por paredes celulósicas, sendo 3 min. suficientes para corar estas estruturas (Figs. 1 e 2). Na coloração com safranina, hematoxilina e orange G, usando-se ácido tânico e cloreto férrico, a intensidade de cor da bactéria foi bem mais acentuada do que na coloração com azul de astra e fucsina, porém ainda com a mesma cor do corpo do nematóide, células de alimentação (células gigantes) e outras células vegetais. A hematoxilina por apresentar afinidade por tecidos em geral, corou todos os constituintes celulares, células gigantes, nematóide e colônias bacterianas, inibindo a coloração por safranina e orange

G, ficando todos os cortes com coloração roxa, e as paredes celulares ficaram escurecidas em função da reação com ácido tânico e cloreto férrico (Figs. 3 e 4). É possível que os tempos de coloração não tenham sido adequados.

Na coloração quádrupla-triarca, notou-se a distinção nítida de cores entre as colônias bacterianas, coradas pelo cristal violeta, e o conteúdo do corpo de seu hospedeiro. As células de alimentação do nematóide e as células da raiz ficaram bem distintas entre si em razão da coloração pelo fast green (Fig. 5). Foi necessário aumentar o tempo de permanência na solução corante para maior distinção das estruturas. Com a utilização desta técnica, pode-se realizar, mais facilmente, estudos do desenvolvimento de *P. penetrans* que incluem a distinção e classificação das diferentes fases do desenvolvimento vegetativo e esporulação desta (Fig. 6), assim como estudos da interação entre bactéria e nematóide, infectando diferentes plantas hospedeiras, através da observação de mudanças na anatomia das células da planta. Portanto, para a coloração de cortes histológicos de raízes com nematóides do gênero *Meloidogyne* parasitados por *P. penetrans*, a técnica de coloração quádrupla-triarca apresentou os melhores resultados.



LITERATURA CITADA

- DAYKIN, M. D. & R. S. HUSSEY. 1985. Staining and histopathological techniques in nematology. In: BARKER, K. R.; C. C. CARTER & J. N. SASSER (eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Vol. II: Methodology. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 39-48.
- DICKSON, D.W.; M. OOSTENDORP; R. M. GIBLIN-DAVIS & D. J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN,

- D.; F. D. BENNETT & J. L. CAPINERA (eds). Pest management in the subtropics. Biological control: A Florida perspective. Andover, Intercept Ltd., p.575-601.
- FOSTER, A. S. 1934. The use of tannic acid and iron chloride for staining cell walls in meristematic tissue. *Stain Technology*, 9(3): 91-92.
- GOMES, C. B. ; L. G. FREITAS & L. G. O. TOMÉ. 1999. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras conduzidas em dois tipos de vasos. *Fitopatologia Brasileira*, 24(Suplemento): 345(Resumo).
- HAGQUIST, C. W. 1974. Preparation and care of microscope slides. *American Biology Teacher*, 36(4): 414-417.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co., 532p.
- KRAUS, J. E. & M. ARDUIN. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica, RJ, Editora Universidade Rural, 198p.
- KROPP, U. 1972. Leitbündel. *Mikrokosmos*, 61(11):342-345.
- LILLIE, R. D. (ed). 1990. H. J. Conn's *Biological Stains: a handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory*. 9^a ed. St. Louis, Sigma Chemical Company, 692p.
- ROESER, K. R. 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer. Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos*, 61(2): 33-36.
- STIRLING, G. R. & M. F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.
- STIRLING, G. R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, 74: 55-60.
- WILLIAMS, A. B.; G. R. STIRLING; A. C. HAYWARD & J. PERRY. 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Applied Bacteriology*, 67:145-156.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. Parasitando Diferentes Espécies Vegetais¹

ADRIANA KISTER RODRIGUES^{2,4}, LEANDRO GRASSI DE
FREITAS² & ARISTÉA ALVES AZEVEDO³

RESUMO

Rodrigues, A. K., L. G. Freitas & A. A. Azevedo. 2001. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies vegetais. **Nematologia Brasileira**.

A bactéria *Pasteuria penetrans* é um parasita obrigatório do nematóide das galhas e produz esporos que persistem por anos no solo. A sua produção por cultivo *in vitro* ainda é inviável e a produção de inóculo requer o seu cultivo *in vivo* em nematóides parasitando plantas em vasos. Neste trabalho buscou-se, por meio do estudo histológico de raízes, averiguar diferenças no desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), maxixe (*Cucumis anguria*) e camapu (*Physalis angulata*), e possíveis razões para estas diferenças, como forma e tamanho de células gigantes e das fêmeas do nematóide. O maxixe foi o pior dentre os hospedeiros em teste para a produção de inóculo e apresentou células gigantes anormais. A estrutura das células gigantes assim como o desenvolvimento da bactéria foram semelhantes no camapu e no tomate, entretanto o ciclo de vida de *P. penetrans* foi ligeiramente mais curto no tomateiro.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Pasteuria penetrans*, coloração, microscopia, plantas hospedeiras.

SUMMARY

Rodrigues, A. K., L. G. Freitas & A. A. Azevedo. 2001. Development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne* spp. parasitizing different host plants. **Nematologia Brasileira**.

The bacterium *Pasteuria penetrans* is an obligate parasite of root-knot nematodes and produces spores that persist in soil for many years. At present the *in vitro* cultivation is not feasible, therefore the inoculum production requires *in vivo* cultivation, inside nematodes parasitizing potted plants. In this work, differences in the development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne* spp. parasitizing roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*), gherkin (*Cucumis anguria*) and camapu (*Physalis angulata*), were evaluated by histopathology of infected roots. Possible reasons for these differences, such as change in the giant cells or nematode females, were analyzed. The gherkin was the worst host for inoculum production and presented abnormal giant cells. The anatomy of giant cells and the bacterium development were similar in tomato and camapu root systems, but the *P. penetrans* life cycle was slightly shorter in tomato than in camapu.

Key words: *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Pasteuria penetrans*, coloration, microscopy, host plants.

¹Parte da Dissertação de Mestrado em Fitopatologia do 1º autor desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa/UFV.

²Departamento de Fitopatologia e ³Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG, Brasil.

⁴Autor para correspondência: akister@bol.com.br

INTRODUÇÃO

As perdas na produtividade agrícola atribuídas a nematóides são estimadas em cerca de 100 bilhões de dólares anualmente (Sasser & Freckman, 1987). Medidas de controle deste nematóide ainda são pouco eficientes, como o uso de variedades resistentes, devido à mistura de espécies no campo, e a aplicação de nematicidas. Estes são caros, pouco eficientes e muito tóxicos. Vários nematicidas já foram retirados do mercado devido aos seus efeitos nocivos ao ecossistema, a persistência no solo e a contaminação do lençol freático. Esforços têm sido concentrados na integração de

agentes de controle biológico e outras estratégias de controle de nematóides (Jatala, 1985). Com o controle biológico, há possibilidade de se resgatar o equilíbrio populacional de nematóides no ecossistema natural e reduzir danos econômicos, em consonância com os organismos e usuários do ecossistema agrícola (Campos, 1992).

Pasteuria penetrans (Thorne) Sayre & Starr é um parasita obrigatório do nematóide das galhas, que previne a produção de ovos pela fêmea e impede a penetração dos juvenis nas raízes. Os esporos desta bactéria são muito resistentes às intempéries e persistem por anos no solo (Campos, 1992). Entretanto, sua produção por cultivo *in vitro* ainda é inviável (Willians et al., 1989) e a produção de inóculo requer o seu cultivo *in vivo* em nematóides parasitando plantas em vasos (Stirling & Wachtel, 1980).

Para ocorrer o parasitismo, é necessário a adesão dos esporos de *P. penetrans* à cutícula dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp., e quando o esporo está maduro e envolto pelo esporângio (fase IV), a adesão é prejudicada e pode reduzir a eficiência do inóculo bacteriano na forma de suspensão de esporos (O'Brien, 1980; Stirling et al., 1986). Algumas técnicas podem ser utilizadas para o rompimento do esporângio, como o tratamento em ultra-som (Stirling et al., 1986; Davies et al., 1988), ou incubação em água destilada (O'Brien, 1980), tomando os esporos aptos à adesão, totalmente maduros (fase V). Entretanto, a obtenção de esporos sem esporângios, o que ocorre no final do ciclo da bactéria, talvez possa ocorrer em menor período de tempo numa espécie vegetal que permita uma melhor multiplicação do nematóide das galhas. Diferenças na duração do ciclo de vida de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne javanica* parasitando diferentes hospedeiros já foram observadas (Gomes, 1999), sendo a espécie vegetal importante para a produção de inóculo da bactéria *in vivo* para posterior aplicação no campo. Observou-se que o maxixe foi um mau hospedeiro e que o tomateiro e o camapu se comportaram como bons hospedeiros de *M. javanica* parasitado por *P. penetrans* (Gomes, 1999).

O juvenil (J2) penetra as raízes do hospedeiro susceptível e migra intercelularmente até atingir o protoxilema no cilindro vascular (Wyss, et al., 1992), onde se desenvolve, induzindo a modificação das células do hospedeiro, formando um sítio de alimentação com várias células gigantes multinucleadas (Huang, 1985; Pedrosa et al., 1996). Estas células de alimentação são estruturas altamente especializadas com a função de fornecer nutrientes para o desenvolvimento e reprodução do parasita (Hussey, 1985; Sijmons et al., 1994). São maiores que as células normais da planta, com muitos núcleos, paredes finas e citoplasma denso com muitas organelas (Bird, 1974). São de alta atividade

metabólica, atuando como células de transferência, metabolizando os fotossintatos do hospedeiro para serem consumidos pelo nematóide (Pedrosa, et al., 1996).

O presente trabalho teve como objetivo a observação do desenvolvimento de *P. penetrans* em *M. javanica* e em *M. incognita* em populações puras, ou em população mista de ambas, em diferentes espécies de plantas hospedeiras, do sítio de alimentação induzido pelos nematóides e da relação destes fatores com a produção e desenvolvimento de esporos de *P. penetrans*.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Efeito da espécie de *Meloidogyne* e da planta hospedeira na maturação de *P. penetrans*

Foram utilizadas as espécies *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, multiplicadas separadamente em tomateiros em casa de vegetação, e os hospedeiros tomateiro (*Lycopersicon esculentum* grupo Santa Cruz), maxixe (*Cucumis anguria*) e camapu (*Physalis angulata* L.), para se verificar mediante exames histológicos, em microscopia de luz, possíveis diferenças no desenvolvimento de *Pasteuria penetrans*. Dentre estas plantas, o tomateiro foi escolhido como hospedeiro-padrão pois já é utilizado para a multiplicação *in vivo* de *P. penetrans* (Stirling & Wachtel, 1980), o maxixe foi usado como mau hospedeiro e o camapu como bom hospedeiro alternativo ao tomateiro (Gomes, 1999). Sementes destas plantas, foram semeadas diretamente em copos plásticos de 500ml com mistura solo e areia (1:2), previamente tratada com brometo de metila. Foi utilizado um isolado de *Pasteuria penetrans*, que apesar de ter sido obtido de fêmeas de *M. arenaria* raça 1, multiplica-se bem em *M. javanica* e *M. incognita*. Este isolado foi multiplicado e mantido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV, parasitando *M. javanica* em tomateiro do grupo Santa Cruz. Esporos de *P. penetrans* foram obtidos a partir de fêmeas retiradas inteiras de dentro de galhas de raízes e posteriormente esmagadas em água destilada. Os esporos em suspensão foram submetidos ao ultra-som (Stirling et al., 1986; Davies et al., 1988) em um processador ultrasônico Cole Parmer de 70-watts para promover o rompimento do esporângio e facilitar a adesão ao nematóide. A suspensão de esporos foi ajustada em hemacitômetro para 10^5 esporos/ml. A adesão dos esporos aos juvenis de segundo estágio (J2) foi realizada em agitador orbital, até que cerca de 80% dos juvenis apresentassem de cinco a quinze esporos aderidos à sua cutícula (Giannakou et al.,

1999). As plantas quando apresentaram cerca de 10 cm de altura foram inoculadas com uma suspensão de nematóides e bactérias, na proporção de 800 J2/planta, depositada em quatro orifícios no solo, ao redor da planta. Os tratamentos se constituíram de inoculações com diferentes suspensões de nematóides, sendo que a primeira constou de nematóides da espécie *M. incognita* (MI), a segunda consistiu na mistura de duas espécies, 50% de *M. javanica* e 50% de *M. incognita* (MJ + MI), e a terceira de nematóides da espécie *M. javanica* (MJ). Utilizaram-se três tratamentos por espécie vegetal e quatro repetições, totalizando 36 plantas, que foram mantidas em câmara de crescimento a 26°C para prolongar o ciclo da bactéria. Estas plantas foram irrigadas e adubadas com macro e micronutrientes. A avaliação foi realizada 67 dias após a inoculação.

2) Ciclo de vida de *P. penetrans* em diferentes espécies hospedeiras de *Meloidogyne*

Foi usada neste ensaio uma população mista de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, de aproximadamente 50% de cada espécie, multiplicadas em tomateiros em casa de vegetação. Tomateiro, maxixe e camapu foram escolhidos para se verificar possíveis diferenças no desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* parasitando *Meloidogyne* spp., mediante visualização em microscopia de luz. Sementes desses hospedeiros foram semeadas em copos plásticos de 500ml com mistura solo e areia (1:2), previamente tratada com brometo de metila. Foram retiradas 20 fêmeas infectadas, das raízes de duas plantas de cada espécie vegetal, em cada uma das 12 avaliações. Estas 72 plantas foram irrigadas e adubadas periodicamente com macro e micronutrientes.

Foi utilizado o mesmo isolado de *Pasteuria penetrans* do experimento anterior, e submetido às mesmas técnicas de rompimento do esporângio e adesão ao corpo do nematóide; e uma suspensão de J2 de *M. javanica* e *M. incognita*, na mesma proporção. Cada planta foi inoculada quando apresentava cerca de 10 cm de altura, com uma suspensão de 800 J2 com esporos, espalhada em quatro orifícios no solo, cerca de 1 cm, ao redor da planta. Os hospedeiros foram mantidos em câmara de crescimento sob temperatura controlada de 26°C, para que o ciclo de vida de *P. penetrans* se prolongasse e fosse possível determinar mudanças de estádios predominantes no decorrer das avaliações. A partir dos 25 dias após a inoculação (DAI), o sistema radicular com galhas de cada espécie vegetal foi colhido, a cada 7 dias, para obter as fêmeas infectadas.

Em cada data de avaliação, porções de raízes com galhas foram destacadas ao acaso do sistema radicular. Destas galhas, retiraram-se, com estilete metálico, fêmeas de *Meloidogyne* spp. infectadas pela bactéria. Em cada amostra coletada, dez fêmeas infectadas tiveram seu conteúdo classificado, com relação aos estádios de vida predominantes da bactéria em questão. As fêmeas foram montadas em lactofenol contendo azul de algodão, e esmagadas ao se pressionar a lamínula sobre a lâmina de microscopia, para que a cutícula fosse rompida. Os estádios de desenvolvimento de *P. penetrans* foram baseados nos dados de Williams (1960), Sayre & Starr (1985), Hatz & Dickson (1992), Chen et al. (1997) e Serracin et al. (1997). A classificação em fases baseou-se no estágio predominante, isto é, quando mais de 50% das estruturas bacterianas no interior de cada nematóide estivesse em uma das seguintes fases: 1) estágio vegetativo inicial – colônias com formas esféricas e sem engrossamento das extremidades do micélio; 2) estágio de diferenciação – engrossamento das extremidades do micélio e fragmentação das colônias; 3) estágio de esporulação – extremidades dilatadas se destacam das colônias e apresentam formato de losango; 4) estágio de maturação – esporos elipsóides livres e com parede esporangial claramente visível; 5) estágio de esporo maduro – esporo completamente formado e livre do esporângio (Figura 1). Os estádios de vida foram determinados, mediante o exame do conteúdo do corpo da fêmea, ao microscópio de luz (objetiva de 40x); fotomicrografados e registrados em filme fotográfico Kodak Gold 100 ASA, em microscópio Olympus AX 70 com sistema U-Photo.

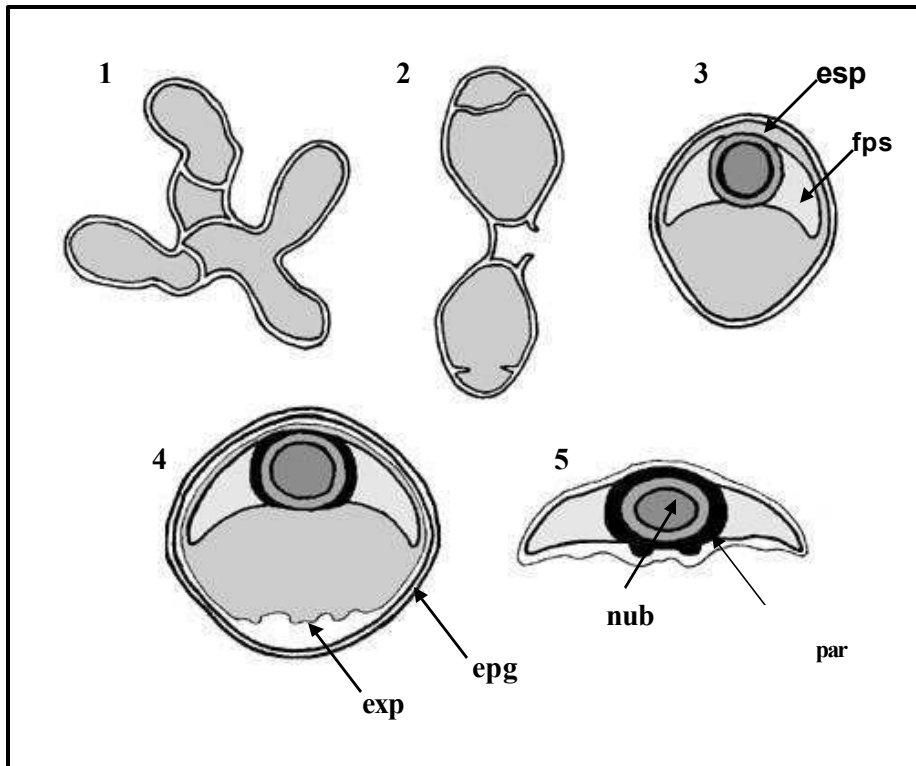


Figura 1. Fases de desenvolvimento de *Pasteuria penetrans*. 1) estágio vegetativo inicial (desenvolvimento micelial); 2) fragmentação da colônia; 3) esporulação (formação do esporo); 4) maturação do esporo (envolto pelo esporângio); 5) esporo maduro (livre do esporângio). **esp** = esporo; **fps** = fibras parasporais; **exp** = exósporo; **epg** = esporângio; **nub** = núcleo bacteriano; **par** = parede do esporo.

Porções com galhas foram retiradas das raízes, cuidadosamente lavadas em água corrente para que não ocorresse fermentos e desalojamento de fêmeas, e fixadas em FAA₅₀ (Johansen, 1940) por 24 horas. Em seguida foi iniciado o processo de desidratação em série etílico-butílico (Johansen, 1940). O corante eritrosina foi adicionado na primeira transferência para álcool etílico absoluto (AE) para que se pudesse visualizar o material após a inclusão em parafina. Na última transferência para álcool butílico terciário puro (TBA), após 40 minutos de permanência neste álcool, foi adicionado igual volume de parafina fundida, mantendo-se à temperatura ambiente por uma noite. No dia seguinte, este volume foi substituído por parafina pura e deixado em estufa à 68°C por 1 hora, com repetição da troca, e deixado por mais 1 hora na estufa. Em seguida, o material foi emblocado com o uso de formas apropriadas, em mistura de parafina (92%) + cera de abelha fundida (8%), deixando-se esfriar sobre placa de gelo

até solidificação do bloco. Os blocos solidificados foram armazenados em geladeira até a sua utilização.

Cortes transversais de raízes, com 12 a 15 µm de espessura, foram preparados em micrótomo rotativo, e a seguir depositados em lâminas de vidro untadas com adesivo de Haupt (Johansen, 1940) e água. As lâminas foram colocadas sobre placa aquecida a fim de promover a distensão da parafina. Após dois dias de secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram colocadas em cubas (Becker, 1997) e submetidas à desparafinização e coloração conforme a técnica de coloração quádrupla-triarca proposta por Hagquist, 1974 (Daykin & Hussey, 1985), na qual se usam safranina, cristal violeta, orange G e fast green. Os cortes foram desparafinados e passados duas vezes em xileno-etanol 100% 1:1 (v/v), durando 5 a 10 minutos cada passagem. As lâminas foram hidratadas em série etanólica até álcool 70% e coradas com safranina O 1% em álcool 50% por 15 a 25 minutos. Após lavagem em água destilada, o material foi corado com cristal violeta 1%, por 2 a 5 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada, imersas em álcool absoluto por duas vezes, 30 segundos cada, e coradas com orange G (135 ml) + fast green (15 ml), 3 a 8 minutos; orange G (145 ml) + fast green (5 ml), orange G (148 ml) + fast green (2 ml), e em orange G por 2 a 5 minutos. O material permaneceu em etanol absoluto por 1 min. e foi passado por duas vezes, 5 min. cada, em xileno. Aí permaneceu até a montagem das lâminas em bálsamo do Canadá, cobertos com lamínula e deixadas em estufa à 42°C até a secagem. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Olympus AX 70, com sistema U-photo utilizando-se filme Kodak Gold 100 ASA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) Efeito da espécie de *Meloidogyne* e da planta hospedeira na maturação de *P. penetrans*

Considerando primeiramente o efeito da espécie de *Meloidogyne* no desenvolvimento da bactéria, observou-se que esporos de *P. penetrans* produzidos em *M. incognita* (Mi) parasitando plantas de maxixe, estavam predominantemente maduros e envoltos pelo esporângio (fase IV). Cerca de 10% dos esporos estavam sem o esporângio (fase V) e aproximadamente 30% estavam nas fases II ou III. Em plantas inoculadas com *M. javanica* + *M. incognita* (Mj + Mi) 70% dos esporos de *P. penetrans* apresentavam-se na fase IV, 15% na fase V e cerca de 15% nas fases II e III. As plantas

inoculadas com *M. javanica* (Mj) também apresentaram esporos predominantemente na fase IV (70%), os na fase V eram de aproximadamente 10%, porém, com mais esporos nas fases II e III do que em Mj + Mi, apresentando aproximadamente 20% dos esporos em uma destas duas fases (Figura 2A).

No tomateiro com Mi, 70% dos esporos estavam na fase IV, poucos na fase III (5%) e aproximadamente 25% dos esporos estavam na fase V. Em inoculações com Mj + Mi, 80% dos esporos observados estavam na fase IV e o restante nas fases III e V (aproximadamente 10% em cada fase). O desenvolvimento mais rápido e homogêneo da bactéria ocorreu nas plantas inoculadas com Mj, apresentando fase V predominante (60%), cerca de 30% na fase IV e poucos esporos na fase III (10%) (Fig. 2B). De acordo com Garate et al. (1991), Baum et al. (1994) e Blok et al. (1997), que utilizaram métodos moleculares para analisar o parentesco entre as espécies mais comuns de *Meloidogyne*, *M. javanica* e *M. arenaria* são mais próximas geneticamente entre si do que *M. incognita* e *M. arenaria*. Como o isolado de *P. penetrans* utilizado neste estudo foi originalmente obtido de *M. arenaria*, seu melhor desenvolvimento em *M. javanica* talvez seja consequência do maior parentesco entre estas duas espécies de nematóides. Além disto, este isolado vem sendo multiplicado em casa de vegetação parasitando *M. javanica*, o que pode ter levado à uma adaptação à este hospedeiro, como indicam Davies e colaboradores (1994).

Em camapu, as plantas que foram inoculadas com Mj apresentaram esporos predominantemente na fase IV (80%). Esporos nas fases III (5%) e V (15%) também foram observados. Em plantas inoculadas com Mj + Mi, a fase IV predominou (aproximadamente 60%) e observaram-se muitos esporos na fase V. Esporos nas fases II e III não foram observados em Mj + Mi. Plantas inoculadas com Mi obtiveram 55% dos esporos na fase IV, muitos na fase V (aproximadamente 40%) e poucos esporos na fase III (Fig. 2C). Desconhece-se o nível de suscetibilidade de camapu a *M. incognita* e *M. javanica*, mas como o bom desenvolvimento de *P. penetrans* depende do bom desenvolvimento do nematóide na planta hospedeira, infere-se que talvez o camapu seja melhor hospedeiro de *M. incognita* do que de *M. javanica*. No entanto, são necessários estudos para comprovar esta hipótese.

No maxixe e no camapu o desenvolvimento mais rápido e homogêneo de *P. penetrans* ocorreu em plantas inoculadas com população mista de Mj + Mi, onde se observou a predominância de esporos na fase IV. No camapu, não foram observados

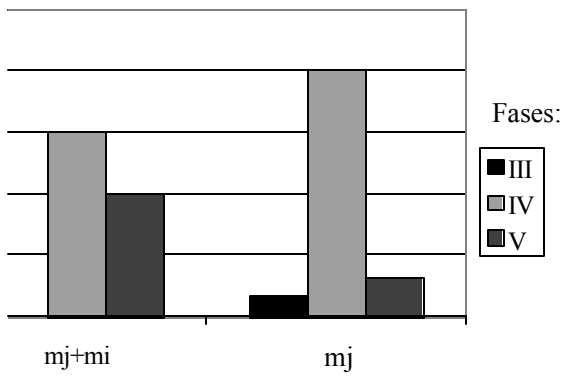
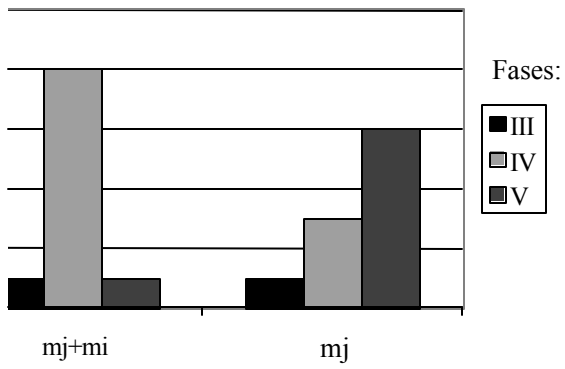
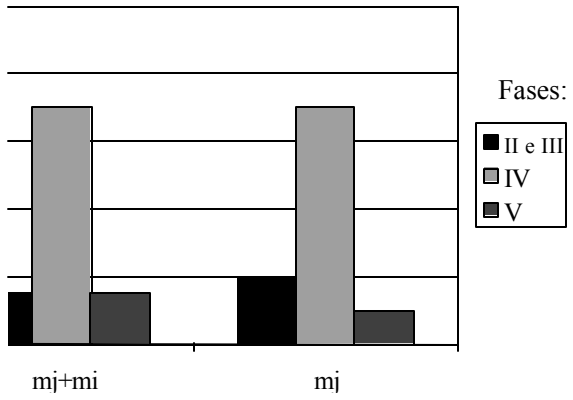


Figura 2. Diferentes fases de desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, em população pura e mista, parasitando: A) maxixe (*Cucumis anguria*), B) tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), e C) camapu (*Physalis angulata*) a 26°C após 67 dias da inoculação.

fase V ocorreu em maior quantidade, em aproximadamente 40% das observações. Já, no maxixe, esporos imaturos (fases II e III) foram observados (Figs. 3 e 4). No tomateiro, o desenvolvimento mais rápido de *P. penetrans* foi obtido em plantas inoculadas com Mj, onde se observou a predominância da fase V (60% aproximadamente), poucos esporos na fase III (10%) e o restante classificado como fase IV (cerca de 30%) (Figs. 5 e 6).

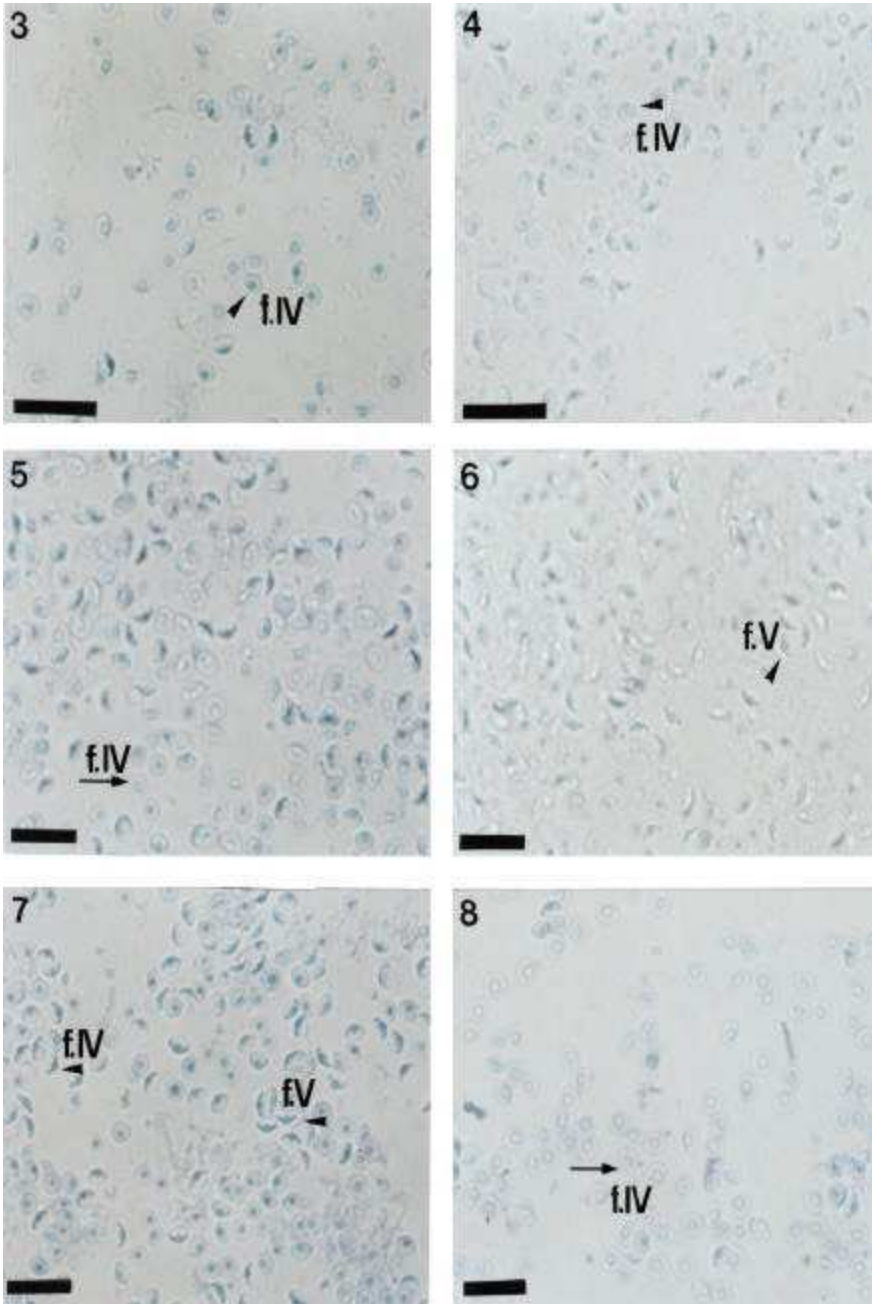
Os resultados mostraram que o desenvolvimento de *P. penetrans* foi semelhante nas duas espécies de nematóides, que apresentaram predominantemente esporos maduros, porém envoltos pelo esporângio (fase IV), o que prejudica a adesão e reduz a eficiência do inóculo bacteriano (O'Brien, 1980; Stirling et al., 1986). Esta semelhança no desenvolvimendo é um indício de que o isolado usado, não apresentando elevada especificidade, aderiu-se e desenvolveu-se bem nas duas espécies de *Meloidogyne*. Tal fato está em concordância com Dickson e colaboradores (1994), que relatam que isolados de *P. penetrans* podem aderir-se a diferentes populações, espécies e até mesmo gêneros de nematóides.

Os resultados observados no tomateiro, mostraram a característica de bom hospedeiro de *Meloidogyne* spp. e confirmaram as observações de Stirling & Wachtel (1980), Davies et al. (1988, 1991), Dickson et al. (1994), Freitas et al. (1997), Serracin et al. (1997), Giannakou et al. (1999) e Gomes et al. (1999) de que esta planta é adequada para multiplicação de *P. penetrans*. Os melhores resultados foram obtidos nas plantas inoculadas com *M. javanica*, que apresentaram maior frequência de esporos maduros (Fig. 6).

No camapu, os resultados obtidos confirmaram as características de bom hospedeiro de *Meloidogyne* spp. (Gomes, 1999), e demonstraram que esta planta também é um bom hospedeiro para multiplicação de *P. penetrans* em *Meloidogyne* spp. Entretanto, observou-se maior homogeneidade de fases de desenvolvimento nos esporos em plantas inoculadas com *M. incognita*, que tinham mais esporos maduros que plantas inoculadas com *M. javanica* (Figs. 7 e 8). Talvez o camapu seja um melhor hospedeiro para multiplicação de *P. penetrans* parasitando *M. incognita* (Fig.7). Mais estudos são necessários para confirmar os resultados, e tornar possível o uso desta planta para multiplicação da bactéria em casa de vegetação, pois uma das vantagens para o seu cultivo é a menor incidência de doenças que no tomateiro.

Ao analisar o efeito da planta hospedeira no desenvolvimento de *P. penetrans*, observou-se que em maxixe este desenvolvimento é mais lento e desuniforme pois apresentou maior frequência de fases iniciais (II e III) (Fig. 9A), com relação ao tomate e camapu, nas duas espécies de nematóides, que apresentaram maior frequência de fase

V (Figs. 9B e 9C). Um fato que talvez explique este resultado, seja que esta planta é má hospedeira de *Meloidogyne* spp. (Gomes, 1999).



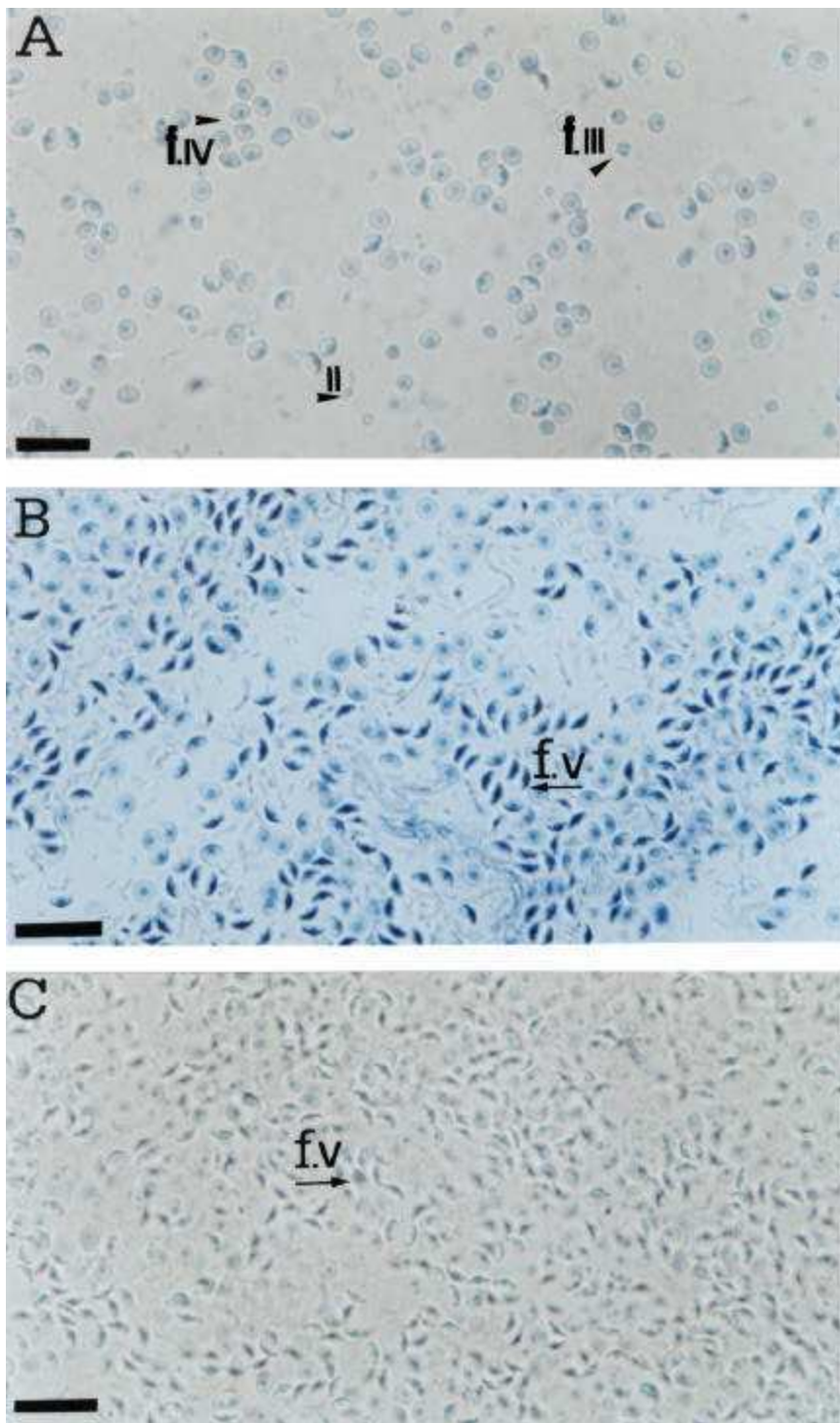


Figura 8. Comparação do desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies de plantas. A) maxixe (*Cucumis anguria*) – esporos nas fases II, III e IV. B) tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) e C) camapu (*Physalis angulata*)- esporos na fase V. Barra = 15 μ m.

2) Ciclo de vida de *P. penetrans* em diferentes espécies hospedeiras de *Meloidogyne*

No 25º dia após a inoculação (DAI), quando realizada a primeira avaliação, os três hospedeiros apresentaram a bactéria *P. penetrans* na fase I de desenvolvimento, isto é, em estágio vegetativo inicial (Figura 10A). Na 3ª avaliação, aos 39 DAI, o maxixe apresentou colônias nas fases I e II (Figs. 10A e 10B), o tomateiro e o camapu apresentaram desenvolvimento mais rápido da bactéria *P. penetrans*, presença de esporos na fase III (Fig. 10C). A partir dos 60 DAI, nos três hospedeiros haviam esporos nas fases iniciais II e III, e fase IV predominante (Figs. 10C, 10D e 10E), permanecendo assim até os 81 DAI, quando se observou a ocorrência de esporos na fase V. Dos 88 aos 102 DAI, a fase IV predominava, porém, aumentou a ocorrência de esporos na fase V (Fig. 10F), e as fases iniciais II e III diminuíram. No maxixe não foi possível coletar fêmeas de nematóides aos 102 DAI, pois as plantas estavam no final do ciclo e o sistema radicular apodrecera.

Com estas observações pode-se dizer que o pior hospedeiro para a produção de *P. penetrans* foi o maxixe, em que quase não havia esporos na fase V, além de serem observados muitos esporos em fases iniciais mesmo no final do ciclo da cultura (Fig. 11A). O melhor hospedeiro para produção da bactéria foi o tomateiro, pela quantidade de esporos na fase V no final do ciclo (Figura 11B). O camapu apresentou um bom resultado, com predomínio da fase IV e esporos na fase V, mas em menor quantidade se comparado com o tomateiro (Fig. 11C).

O desenvolvimento de *P. penetrans* neste trabalho foi mais lento do que se encontra usualmente na bibliografia (Stirling, 1981; Dickson et al., 1992; Hatz & Dickson, 1992) pois o experimento foi conduzido em temperatura mais baixa, isto é, 26°C ao invés de cerca de 30°C, que é a ideal para a bactéria, para que se pudesse observar melhor as mudanças de fases. Neste trabalho o ciclo de vida de *P. penetrans*, foi de 102 dias em maxixe, tomateiro, e camapu, constatando o que se observou nos trabalhos de Hatz & Dickson (1992), Chen & Dickson (1997) e Serracin et al (1997).

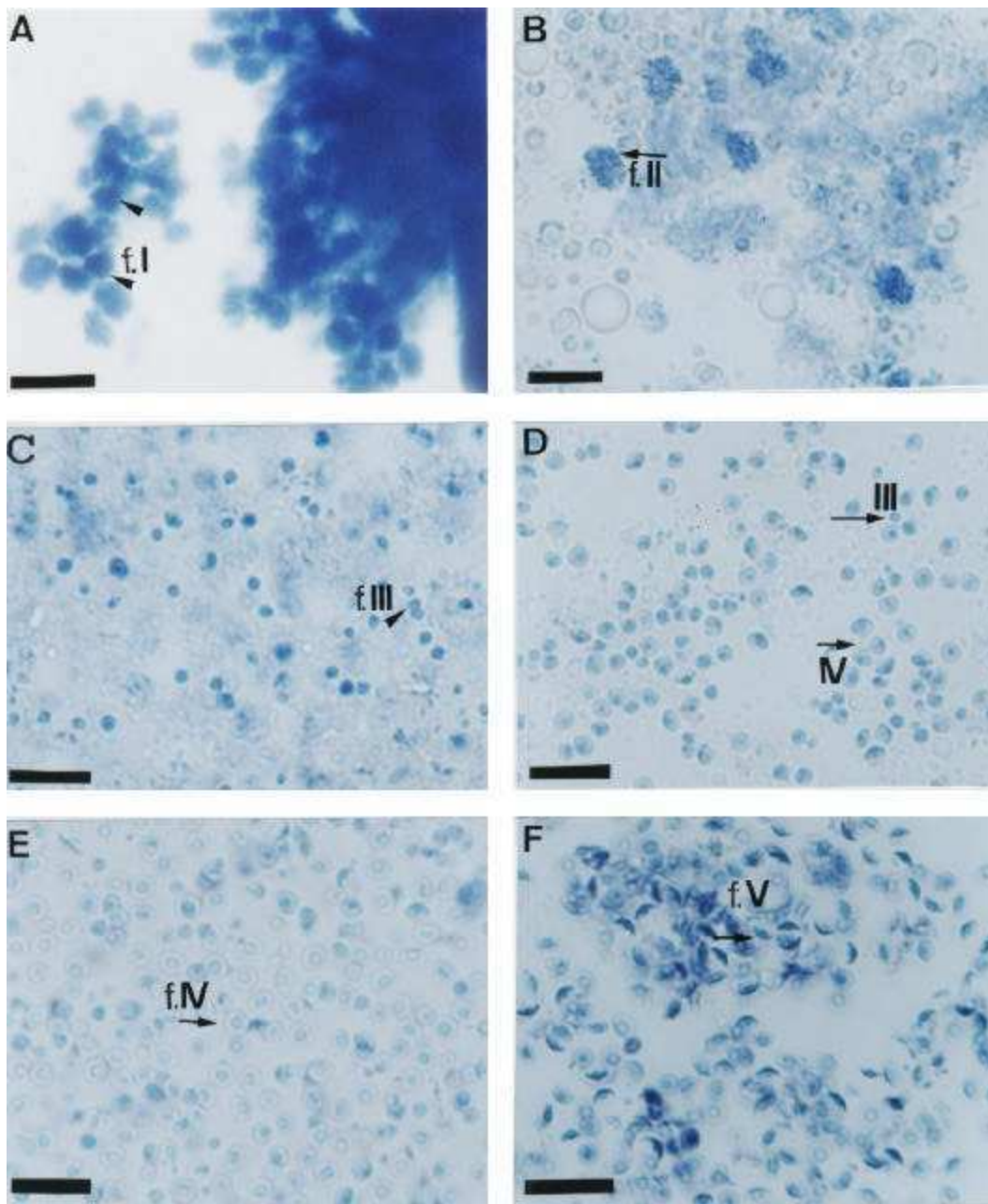
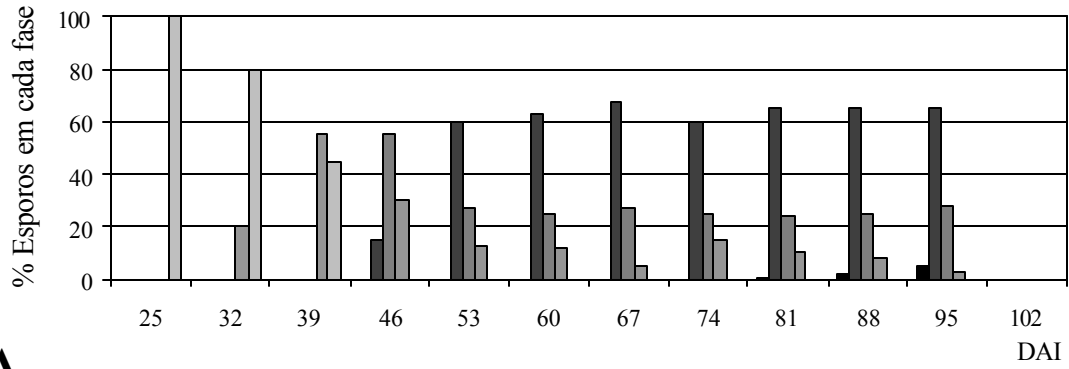
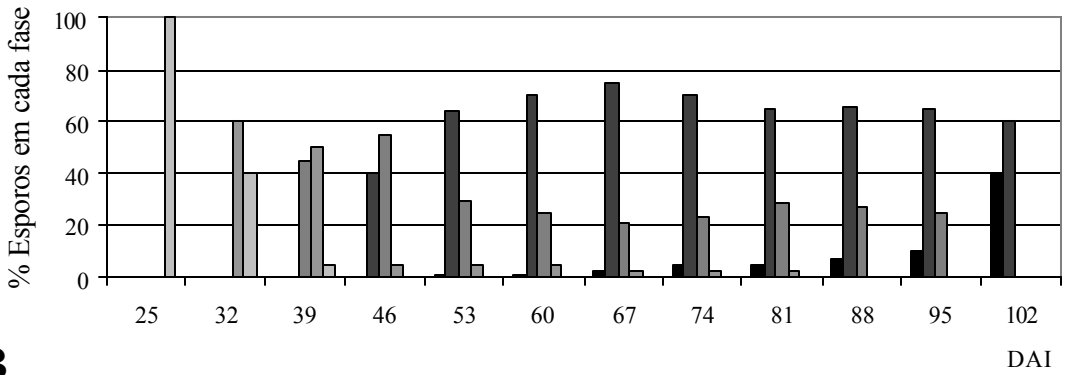


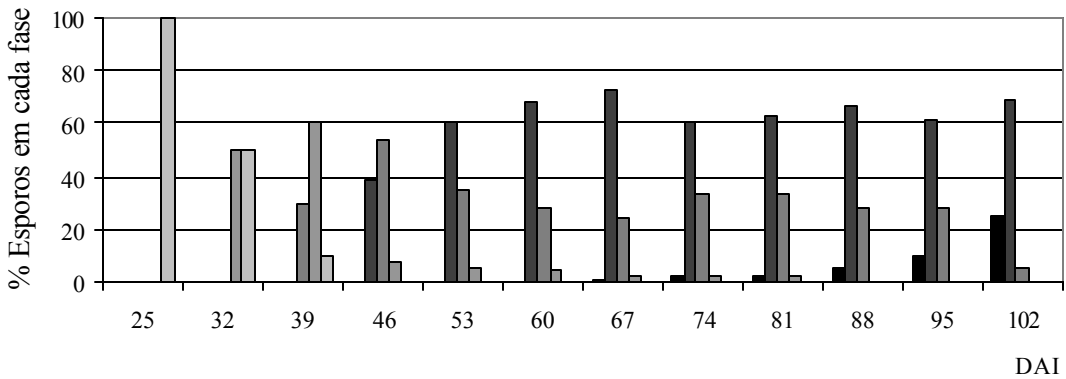
Figura 10. Fotomicrografias de diferentes estádios de desenvolvimento de esporos de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne*. A) Fase I: Estádio vegetativo – colônia com forma esférica. B) Fase II: Diferenciação – muito semelhante à fase I, apresenta engrossamento das extremidades e início da fragmentação de colônias. C) Fase III: Esporulação – extremidades dilatadas das colônias se destacam. D) Fases III e IV (\pm 50% dos esporos em cada fase). E) Fase IV: Maturação – esporos elipsóides livres e com parede esporangial visível. F) Fase V: Esporos maduros – esporos completamente formados e livres dos esporângios, fibras parasporais expostas. Barra = 15 μ m.



A



B



C

Fases V IV III II I

Figura 11. Médias das porcentagens de esporos ocorrendo nos diferentes estádios de desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando plantas de: A) maxixe (*Cucumis anguria*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e C) camapu (*Physalis angulata*), a 26°C em diferentes dias após a inoculação (DAI).

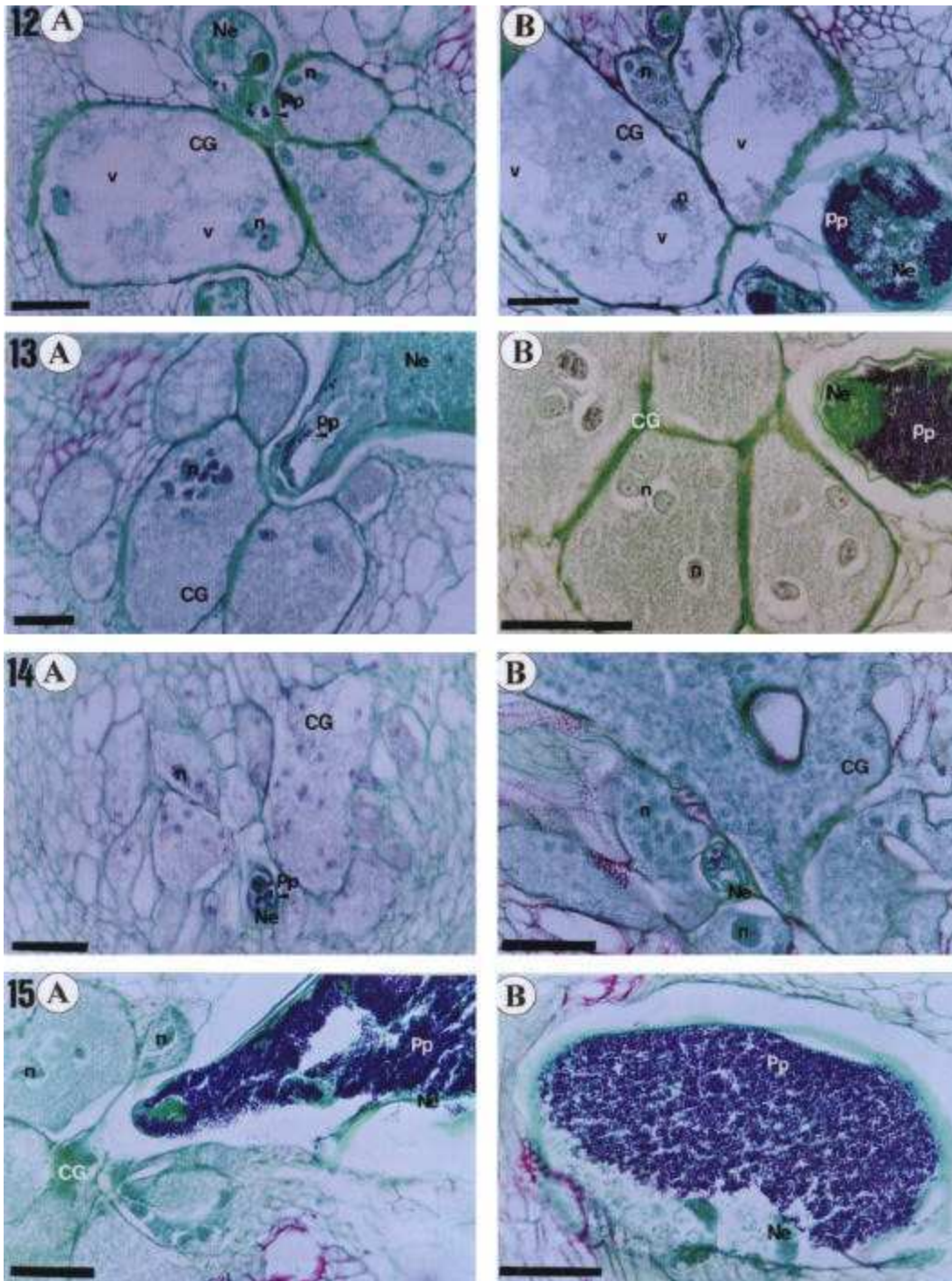
Nos cortes histológicos foi observado o formato das células gigantes induzidas pelo nematóide nos diferentes hospedeiros. O protoplasma apresentou-se granuloso e pouco denso, com grandes vacúolos e número variado de núcleos hipertrofiados e de formatos irregulares, dispersos dentro das células gigantes, dependendo do hospedeiro, conforme trabalhos de Huang (1985), Fawole (1988), Starr (1993) e Pedrosa et al. (1996). As paredes das células gigantes apresentaram-se coloridas pelo fast-green, que tem mais afinidade por paredes celulósicas. Em plantas de tomate, foi normal o aspecto das células gigantes, como descreveu Fawole (1988) e Starr (1993), isto é, com formato alongado e uniforme, geralmente em número de quatro a sete células por fêmea de nematóide, e vários núcleos hipertrofiados, dispersos no citoplasma (Figs. 12A e 12B). No camapu, as células gigantes apresentaram aspecto normal, bem similar ao que se observou no tomateiro. Estas apresentaram-se uniformes, alongadas, com delimitações de paredes bem definidas, e em número de quatro a sete células por nematóide (Figs. 13A e 13B). Nas plantas de maxixe, as células gigantes observadas estavam deformadas e irregulares, as camadas internas da parede pareciam se dissociar, e possuíam vários núcleos de formato irregular e agrupados, não sendo possível determinar o número de células por nematóides (Figs. 14A e 14B).

Através deste estudo histopatológico constatou-se uma relação direta entre o desenvolvimento mais lento da bactéria em maxixe e deformidades no sítio de alimentação do nematóide neste hospedeiro. E talvez esta seja a explicação para o desenvolvimento mais lento de *P. penetrans* neste hospedeiro, confirmando ser um hospedeiro ruim de nematóides (Gomes, 1999), pois produz poucas galhas e as fêmeas de nematóides encontradas são pouco desenvolvidas. O nematóide induziu a formação de células gigantes deformadas, e estas talvez sejam ineficientes na metabolização dos fotossintatos da planta hospedeira e transferência destes para o nematóide. Assim, pode haver uma insuficiência de substâncias nutritivas para o bom desenvolvimento da bactéria.

No tomateiro e no camapu, observou-se melhor desenvolvimento da bactéria, preenchendo completamente o corpo do nematóide, e sítios normais de alimentação (Figs. 15A e 15B). O tomateiro é um bom hospedeiro para a multiplicação de *Meloidogyne* spp., sendo usado para produção de nematóides em vasos (Stirling & Wachtel, 1980), e também bom hospedeiro para multiplicar *P. penetrans* (Davies et al., 1988, 1991; Dickson et al., 1994; Freitas et al., 1997; Serracin et al., 1997; Giannakou et al., 1999 e Gomes et al. 1999). Os bons resultados quanto à maturação dos esporos da bactéria talvez sejam em razão de o nematóide induzir células gigantes bem formadas, e

estas são de alta atividade metabólica, metabolizam os fotossintatos das plantas hospedeiras (Pedrosa et al., 1996), os transferem para o nematóide parasitado, e talvez estes fotossintatos possuam os nutrientes necessários ao bom desenvolvimento da bactéria. E o camapu, uma solanácea, também apresentou um bom desenvolvimento da bactéria.

Estes resultados obtidos no desenvolvimento de *P. penetrans*, confirmam o que foi observado no ensaio anterior, onde a má hospedeira de *Meloidogyne* spp. é também ruim para o desenvolvimento da bactéria. Nas plantas de maxixe, a bactéria desenvolveu-se heterogênea e mais lentamente, apresentando esporos imaturos até a última avaliação. Aqui se observou que as espécies de plantas consideradas como bons hospedeiros para o desenvolvimento de *Meloidogyne* spp., o tomateiro e o camapu, apresentam bons resultados na produção e maturação de *P. penetrans*.



LITERATURA CITADA

- BAUM, T. J.; P. M. GRESSHOFF; S. A. LEWIS & R. A. DEAN. 1994. Characterization and phylogenetic analyses of four root-knot nematode species using DNA amplification fingerprinting and automated polyacrylamide gel electrophoresis. *American Phytopathological Society*, 7(1): 39-47.
- BIRD, A. F. 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annual Review of Phytopathology*, 12: 69-85.
- BECKER, W. F. 1997. O nematóide de cisto *Heterodera glycines* Ichinohe em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.): aspectos do parasitismo, reação de cultivares, herança da resistência e interação com outros microorganismos. Viçosa, MG, UFV, Dissertação (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, 203p.
- BLOK, V. C.; M. S. PHILLIPS; J. W. MCNICOL & M. FARGETTE. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology*, 20(2): 127-133.
- CAMPOS, V. P. 1992. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. In: MIRANDA, G. M. C. (ed). Informe Agropecuário. Belo Horizonte, EPAMIG, 16(172): 26-30.
- CHEN, Z. X. & D. W. DICKSON. 1997. Minimal growth temperature of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 29(4S):635-639 (Suplemento).
- CHEN, Z. X.; D. W. DICKSON; L. G. FREITAS & J. F. PRESTON. 1997. Ultrastructure, morphology, and sporogenesis of *Pasteuria penetrans*. *Phytopathology*, 87: 273-283.
- DAVIES, K. G.; B. R. KERRY & C. A. FLYNN. 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*, 112: 491-501.
- DAVIES, K. G.; V. LAIRD & B. R. KERRY. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Revue de Nématologie*, 14: 611-618.
- DAVIES, K. G.; M. REDDEN & K. PEARSON. 1994. Endospore heterogeneity in *Pasteuria penetrans* related to adhesion to plant-parasitic nematodes. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 370-373.
- DAYKIN, M. D. & R. S. HUSSEY. 1985. Staining and histopathological techniques in nematology. In: BARKER, K. R.; C. C. CARTER & J. N. SASSER (eds). An

Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Vol. II: Methodology. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 39-48.

- DICKSON, D. W.; M. OOSTENDORP & D. J. MITCHELL. 1992. Development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria* race 1 in the field. In: GOMMERS, F. J. & P. W. Th. MAAS (eds). Nematology from molecule to ecosystem. Dundee, Scotland, European Society of nematologists, p. 213-218.
- DICKSON, D. W.; M. OOSTENDORP; R. M. GIBLIN-DAVIS & D. J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D.; F. D. BENNETT & J. L. CAPINERA (eds). Pest management in the subtropics. Biological control: A Florida perspective. Andover, Intercept Ltd, p. 575-601.
- FAWOLE, B. 1988. Histopathology of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection on white yam (*Dioscorea rotundata*) tubers. Journal of Nematology, 20(1): 23-28.
- FREITAS, L. G.; D. J. MITCHELL & D. W. DICKSON. 1997. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1. Journal of Nematology, 29 (4): 547-555.
- GARATE T.; M. P. ROBINSON; M. R. CHACÓN & R. M. F. PARKHOUSE. 1991. Characterization of species and races of the genus *Meloidogyne* by DNA restriction enzyme analysis. Journal of Nematology, 23 (4): 414-420.
- GIANNAKOU, I. O.; B. PEMBROKE; S. R. GOWEN & S. DOULOUMPAKA. 1999. Effects of fluctuating temperatures and different host plants on development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology, 31 (3): 312-318.
- GOMES, C. B.; L. G. FREITAS & L. G. O. TOMÉ. 1999. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras conduzidas em dois tipos de vasos. Fitopatologia Brasileira, 24(Suplemento): 345(Resumo).
- HAGQUIST, C. W. 1974. Preparation and care of microscope slides. American Biology Teacher, 36(4): 414-417.
- HATZ, B. & D. W. DICKSON. 1992. Effect of temperature on attachment, development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology, 24: 512-521.
- HUANG, C. S. 1985. Formation, anatomy, and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In: SASSER, J. N. & C. C. CARTER (eds). An advanced

- treatise on *Meloidogyne*, vol. I: Biology and control. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 155-164.
- HUSSEY, R. S. 1985. Host-parasite relationship and associated physiological changes. In: SASSER, J. N. & C. C. CARTER (eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, vol. I: Biology and Control. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 143-153.
- JATALA, P. 1985. Biology control of nematodes. In: SASSER, J. N. & C. C. CARTER (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. I: Biology and control. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 303- 308.
- JOHANSEN, D. A. 1940. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book Co., 532p.
- O'BRIEN, P. C. 1980. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. Journal of Nematology, 12: 234 (abstr.).
- PEDROSA, E. M. R.; R. S. HUSSEY & H. R. BOERMA. 1996. Cellular responses of resistant and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. Journal of Nematology, 28(2): 225-232.
- SASSER, J. N., & D. W. FRECKMAN. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A. & D. W. DICKSON (eds). Vistas on Nematology. Maryland, Society of Nematologists, p. 7-14.
- SAYRE, R. M. & M. P. STARR. 1985. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 52: 149-165.
- SERRACIN, M.; A. C. SCHUERGER; D. W. DICKSON & D. P. WEINGARTNER. 1997. Temperature-dependent development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology, 29(2): 228-238.
- SIJMONS, P. C.; H. J. ATKINSON & U. WYSS. 1994. Parasitic strategies of root-knot nematodes and associate host cell responses. Annual Review of Phytopathology, 32: 235-259.
- STARR, J. L. 1993. Dynamics of the nuclear complement of giant cells induced by *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 25(3): 416-421.
- STIRLING, G. R. & M. F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. Nematologica, 26: 308-312.
- STIRLING, G. R. 1981. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. Nematologica, 27: 458-462.

- STIRLING, G. R.; A. F. BIRD & A. B. CAKURS. 1986. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie*, 9:251-260.
- WILLIAMS, J. R. 1960. Studies on the nematode soil fauna of sugarcane fields in Mauritius. Notes upon a parasite of root-knot nematode. *Nematologica*, 5: 37-42.
- WILLIAMS, A. B.; G. R. STIRLING; A. C. HAYWARD & J. PERRY. 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Applied Bacteriology*, 67:145-156.
- WYSS, U.; F. M. W. GRUNDLER & A. MUNCH. 1992. The parasitic behaviour of second-stage of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*, 38: 98-111.

CAPÍTULO 3

Efeito do Corte da Parte Aérea da Planta Hospedeira de *Meloidogyne* spp. sobre o Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans*¹

ADRIANA KISTER RODRIGUES^{2,3} & LEANDRO GRASSI DE
FREITAS²

RESUMO

Rodrigues, A. K. & L. G. Freitas. 2001. Efeitos do corte da parte aérea da planta hospedeira de *Meloidogyne* spp. sobre o desenvolvimento de *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira.**

A bactéria *Pasteuria penetrans* é um parasita obrigatório do nematóide das galhas que atua prevenindo a produção de ovos pela fêmea e reduzindo a penetração dos juvenis nas raízes. Além disto, esta bactéria produz esporos muito resistentes às intempéries e persistem por anos no solo. O esporângio que envolve o esporo prejudica a sua adesão à cutícula do nematóide, sendo antes conveniente utilizar algumas técnicas para romper o esporângio. Neste trabalho, testou-se a promoção de estresse ao nematóide hospedeiro através do corte da parte aérea de quatro espécies vegetais hospedeiras do nematóide e da suspensão da irrigação destas plantas para promover a ruptura dos esporângios e acelerar o aparecimento de esporos completamente maduros no interior da fêmea. Também se comparou o desenvolvimento da bactéria em

Meloidogyne spp. parasitando o tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), o tabaco (*Nicotiana tabacum*), o maxixe (*Cucumis anguria*) e o camapu (*Physalis angulata*). O corte da parte aérea e suspensão da irrigação aceleram o amadurecimento dos esporos de *P. penetrans* em todas as plantas, e o tabaco e o tomateiro se destacam como os melhores hospedeiros para este fim.

Palavras chave: *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, plantas hospedeiras.

SUMMARY

Rodrigues, A. K. & L. G. Freitas. 2001. Effects of the cut of the aerial part of the host plant of *Meloidogyne* spp. on the development of *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**.

Pasteuria penetrans is an obligate parasite of the root-knot nematode, *Meloidogyne* sp., which acts preventing egg production by the female, and by reducing root penetration by the juvenile. Furthermore, it produces spores that are very resistant to the environment and persist in the soil for years. The sporangial wall around the spore impairs its adhesion to the nematode cuticle, therefore it is desirable to find means to disrupt it. The stress of the nematode-host plant by cutting the aerial part of four plant species and suspending irrigation were tested to promote the sporangial rupture and accelerate the completion of the spore development inside the female. Also, the development of the bacterium was compared in *Meloidogyne* spp. parasitizing tomato (*Lycopersicon esculentum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), maxixe (*Cucumis anguria*) and camapu (*Physalis angulata*). The shoot removal and irrigation suppression accelerated ripening of the spores of *P. penetrans* in all the plant species evaluated, with tobacco and tomato being as better hosts.

Key Words: *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*, host plants.

¹Parte da Dissertação de Mestrado em Fitopatologia do 1º autor desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa/UFV.

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG, Brasil.

³Autor para correspondência: akister@bol.com.br

INTRODUÇÃO

São estimadas perdas devido a nematóides em todas as culturas de mais de 100 bilhões de dólares anualmente (Sasser & Freckman, 1987). Apesar de serem um fator limitante na produtividade agrícola, medidas de controle ainda são pouco eficientes e específicas. Através do controle biológico, há possibilidade de se resgatar o equilíbrio populacional de nematóides no ecossistema natural, em inteira consonância com os demais organismos e usuários do ecossistema agrícola (Campos, 1992).

Pasteuria penetrans (Thorne) Sayre & Starr é um parasita obrigatório do nematóide das galhas, e atua prevenindo a produção de ovos pela fêmea e impedindo a penetração dos juvenis nas raízes. Esta bactéria produz esporos muito resistentes às intempéries, persistindo por anos no solo (Campos, 1992). Entretanto, sua produção por cultivo in vitro é inviável (Willians et al., 1989) e a produção de inóculo requer o seu cultivo in vivo em nematóides parasitando plantas em vasos (Stirling & Wachtel, 1980).

A adesão dos esporos de *P. penetrans* à cutícula dos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp. é a primeira e imprescindível etapa para o parasitismo. Quando o esporo está envolto pelo esporângio, a adesão é prejudicada, e pode reduzir a eficiência do inóculo bacteriano na forma de suspensão de esporos (O'Brien, 1980; Stirling et al., 1986). Algumas técnicas podem ser utilizadas para o rompimento do esporângio, como o tratamento em ultra-som (Stirling et al., 1986; Davies et al., 1988), ou incubação em água destilada (O'Brien, 1980). Entretanto, a obtenção de esporos sem esporângios, o que ocorre no final do ciclo da bactéria, talvez possa ocorrer em menor período de tempo caso o nematóide passe por algum estresse. Assim, com o objetivo de obter a maior porcentagem de esporos maduros por fêmea de nematóide, foi provocado um estresse em plantas hospedeiras por meio da realização de um ensaio, onde cortou-se a parte aérea e submeteu-se o sistema radicular a um estresse hídrico e comparou-se com plantas não tratadas.

Como diferenças no comprimento do ciclo de vida de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne javanica* parasitando diferentes hospedeiros já foram observadas por Gomes et al. (1999), indicando que a espécie vegetal é importante para a produção de

inóculo da bactéria *in vivo* para posterior aplicação no campo, utilizou-se quatro espécies vegetais para o teste do estresse.

MATERIAL E MÉTODOS

Trabalhou-se com tomateiro (*Lycopersicon esculentum* grupo Santa Cruz), tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun), maxixe (*Cucumis anguria*) e camapu (*Physalis angulata* L.) como hospedeiros, para se verificar possíveis diferenças no desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* parasitando *Meloidogyne* spp., mediante visualização em microscopia de luz. Dentre estas plantas, o tomateiro foi escolhido como hospedeiro-padrão porque é amplamente utilizado para a multiplicação de *P. penetrans* (Stirling & Wachtel, 1980; Davies et al., 1988, 1991; Dickson et al., 1994; Freitas et al., 1997; Serracin et al., 1997; Giannakou et al., 1999); o maxixe foi usado como mau hospedeiro e camapu e tabaco, como possíveis bons hospedeiros alternativos ao tomateiro (Gomes, 1999). Sementes dos hospedeiros anteriormente citados, foram semeadas diretamente em copos plásticos de 500ml contendo mistura de solo e areia (1:2), previamente tratados com brometo de metila. Utilizaram-se duas plantas de cada uma das quatro espécies vegetais por avaliação, em cinco avaliações. Estas 40 plantas foram irrigadas e adubadas com macro e micronutrientes.

Neste trabalho, utilizou-se um isolado de *Pasteuria penetrans* que apesar de ter sido obtido de fêmeas de *M. arenaria* raça 1, multiplica-se bem em *M. javanica* e *M. incognita*. Este isolado foi multiplicado e mantido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV, parasitando *M. javanica* em tomateiro do grupo Santa Cruz. Esporos de *P. penetrans* foram obtidos a partir de fêmeas coletadas de dentro de galhas de raízes e esmagadas. Os esporos foram sonicados em um aparelho Cole Parmer para promover o rompimento do esporângio e facilitar a adesão. A suspensão de esporos foi ajustada em hemacitômetro para 10^5 esporos/ml. Utilizou-se nesse experimento uma suspensão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* e *M. incognita*, na mesma proporção. A adesão dos esporos aos J2 foi realizada através da técnica da agitação em agitador orbital, por um período de tempo em que cerca de 80% dos juvenis apresentassem de cinco a quinze esporos aderidos à sua cutícula (Giannakou et al., 1999). Cada planta foi inoculada quando apresentava cerca de 10 cm de altura, com a suspensão nematóides-bactéria, calibrada para 800 J2 com esporos, depositados em orifícios no solo, cerca de 1 cm, ao redor da planta. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento sob temperatura constante e controlada de 26°C, para que o ciclo

de vida de *P. penetrans* se prolongasse e fosse possível determinar mudanças de estádios predominantes no decorrer das avaliações. Aos 74 dias após a inoculação (DAI), 50% das plantas de cada espécie tiveram a parte aérea cortada, sendo também suspensa a irrigação destas. Raízes com galhas de uma planta inteira (plantas não cortadas – PNC) e uma sem parte aérea (plantas cortadas – PC), de cada espécie vegetal, foram colhidas e as fêmeas de *Meloidogyne* spp. separadas do tecido radicular usando-se estilete.

Os estádios de desenvolvimento de *P. penetrans* foram baseados nos trabalhos de Willians (1960), Sayre & Starr (1985), Hatz & Dickson (1992), e Serracin et al. (1997). A classificação foi em função do estádio predominante, isto é, quando mais de 50% das estruturas bacterianas no interior de cada nematóide estivesse em uma das seguintes fases: 1) estádio vegetativo inicial – colônias com formas esféricas e sem engrossamento das extremidades do micélio; 2) estádio de diferenciação – engrossamento das extremidades do micélio e fragmentação das colônias; 3) estádio de esporulação – extremidades dilatadas se destacam das colônias e apresentam-se com formato de losângos; 4) estádio de maturação – esporos elipsóides livres e com parede esporangial claramente visível; 5) estádio de esporo maduro – esporo completamente formado e livre do esporângio.

Um total de 10 fêmeas infectadas tiveram seu conteúdo classificado, com relação aos estádios de vida predominantes da bactéria em questão, em cada amostra coletada. As fêmeas foram montadas em lactofenol e azul de algodão em lâmina de microscopia, esmagadas ao se pressionar a lamínula sobre a lâmina, para que a cutícula fosse rompida. Os estádios de desenvolvimento de *P. penetrans* foram determinados, mediante o exame do conteúdo do corpo da fêmea, com o uso de microscópio de luz (objetiva de 40x). Fotomicrografias dos estádios de vida foram registradas em filme fotográfico Kodak Gold 100 ASA, em fotomicroscópio Olympus AX 70, com sistema U-Photo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 73 dias após a inoculação foi realizada a primeira observação, onde constatou-se mistura de fases iniciais II e III, os esporos estavam predominantemente na fase IV, e quase não foram observados esporos maduros (fase V).

Uma semana após o corte (81 DAI) observou-se o aumento da fase V, nos hospedeiros maxixe, tomateiro e camapu, em plantas que sofreram a eliminação da parte aérea em contraste com o tratamento mantido com parte aérea, que além de apresentar mistura de fases iniciais (II e III), os esporos estavam predominantemente na fase IV e quase não se encontravam esporos na fase V (Figuras 1A e B; 2A e B; e 3A e B). Camapu e tabaco apresentaram mistura de fases iniciais, mesmo após o corte da parte aérea, mas a fase IV apresentou-se predominante (Figs. 3-B e 4-B).

Com 95 DAI, o tomateiro, o camapu e o tabaco apresentaram, nas plantas cortadas, grande quantidade de esporos nas fases IV e V, em contraste com as plantas não cortadas, que além da predominância da fase IV, apresentaram mistura de fases iniciais (II e III), e poucos esporos na fase V (Figs. 2-A e B; 3A e B; e 4A e B). O maxixe apresentou fase IV predominante, tanto no tratamento de plantas cortadas (PC) como no tratamento de plantas não cortadas (PNC), porém aumentou a ocorrência da fase V em PC, e mistura de fases iniciais em PNC (Figs. 1-A e B; 5 e 6).

Aos 102 DAI, tomateiro e tabaco apresentaram mais esporos maduros em PC, com cerca de 50% de esporos na fase IV e cerca de 50% na fase V. Já em PNC haviam esporos nas fases IV e V, mas com proporção de 60% e 40%, respectivamente (Figs. 2-A e B; 4A e B). O camapu apresentou em ambos tratamentos (PC e PNC), fases IV e V, com cerca de 70% dos esporos na fase IV (Figs. 3A e B; 7 e 8). Nas plantas de tabaco, o ciclo do nematóide foi mais curto e observou-se muitas fêmeas jovens, provindas de escape, em início do 2.º ciclo do nematóide, por este motivo, os resultados não foram tão expressivos como nos outros hospedeiros. As fêmeas obtidas de raízes de plantas sem parte aérea tiveram mais esporos nas fases IV e V que as obtidas de raízes com parte aérea, que apresentaram muita mistura de fases iniciais II e III (Figs. 4-A e B). As plantas de maxixe, com ou sem parte aérea encontravam-se com sistema radicular apodrecido, pois a cultura havia chegado ao final do ciclo. Isto impossibilitou a coleta de fêmeas, pois estas haviam sido desalojadas.

Após o corte da parte aérea, nas quatro espécies vegetais estudadas, observou-se que aos 95 e 102 DAI, o número de esporos nas fases iniciais (II e III) diminuíram em relação às avaliações anteriores, prevalecendo a fase IV, e aumentando os esporos maduros (Figs. 9, 10, 11 e 12). Em nenhum hospedeiro foi observada a presença de fêmeas contendo 100% dos esporos maduros. Em razão do grande número de fêmeas jovens em início do 2.º ciclo, desalojamento de fêmeas que atingiram o final do ciclo de vida, e do apodrecimento de raízes, acredita-se que promover o corte da parte aérea e o

estresse hídrico logo quando começarem a ocorrer fase IV de desenvolvimento, seja mais eficiente como estratégia de obtenção de esporos maduros.

Dentre as espécies vegetais no tratamento de plantas cortadas, o tomateiro e o tabaco apresentaram os melhores resultados apresentando o desenvolvimento de *P. penetrans* mais rápido que nos outros hospedeiros, e também tiveram a maior proporção de fases IV e V (aproximadamente 50% cada) no final do ciclo do nematóide, e não observou-se fases iniciais (Figs. 10 e 12); o camapu apresentou um resultado intermediário com esporos predominantemente na fase IV e poucos na fase V (aproximadamente 30%) (Fig. 8); já as plantas de maxixe foram as piores hospedeiras apresentando desenvolvimento mais lento da bactéria, esporos em fases iniciais mesmo no final do ciclo e com menor quantidade de esporos na fase V (aproximadamente 10%), e fase IV ocorrendo predominantemente (Fig. 6).

O desenvolvimento de *P. penetrans* neste trabalho foi mais lento do que se encontra usualmente na literatura (Stirling 1981; Dickson et al., 1992; Hatz & Dickson, 1992) pois o experimento foi conduzido em temperatura mais baixa, isto é, 26°C ao invés de cerca de 30°C, para que se pudesse observar melhor as mudanças de fases. Neste trabalho o ciclo de vida de *P. penetrans*, foi de 102 dias em maxixe, tomateiro, tabaco e camapu, e está de acordo com os trabalhos de Hatz & Dickson (1992), Chen & Dickson (1997) e Serracin et al (1997).

Em geral, observou-se que com o corte da parte aérea ocorreu uma redução no número de esporos em fases iniciais e um aumento de esporos na fase V (Figs. 10 e 12). Isto é um indicativo de que o estresse na planta hospedeira pode acelerar o amadurecimento de *P. penetrans* no interior do nematóide, mas a espécie vegetal utilizada como hospedeira do nematóide é um fator mais importante para a redução do comprimento do ciclo da bactéria.

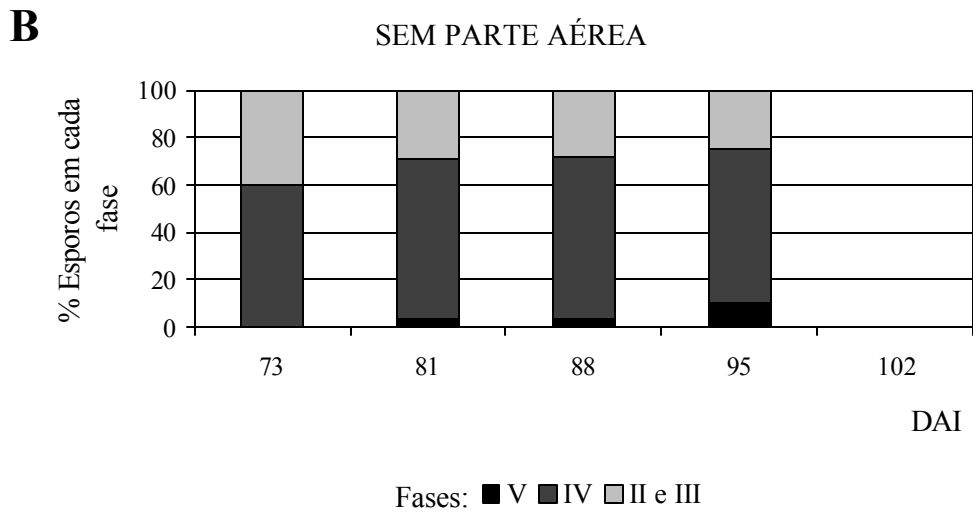
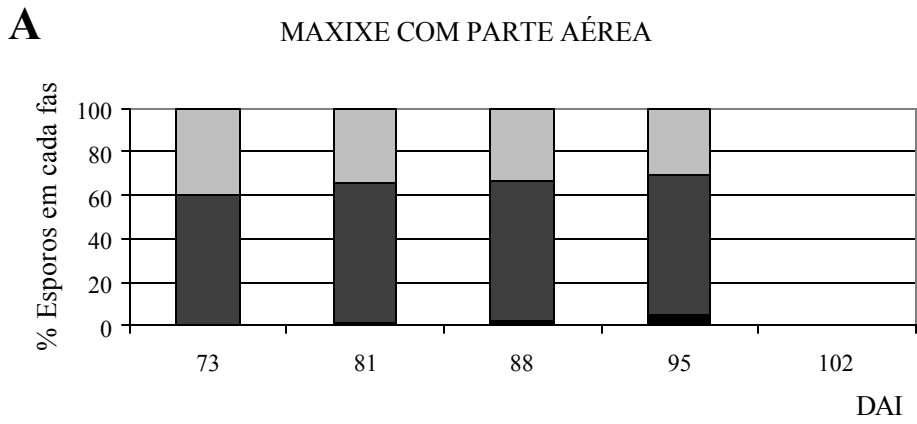


Figura 1 - Médias das porcentagens de esporos ocorrendo nos diferentes estádios de desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* parasitando plantas de maxixe (*Cucumis anguria*) com parte aérea (A) e após o corte da parte aérea (B), aos 73, 81, 88, 95 e 102 dias após inoculação (DAI).

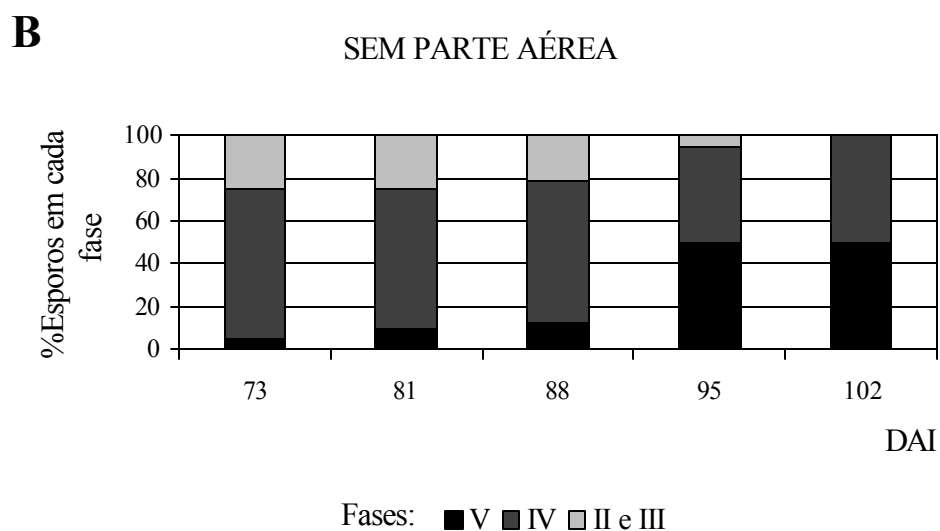
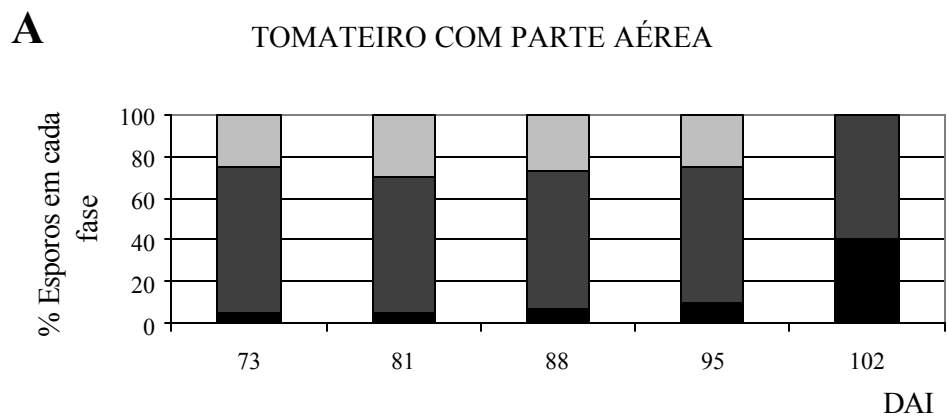
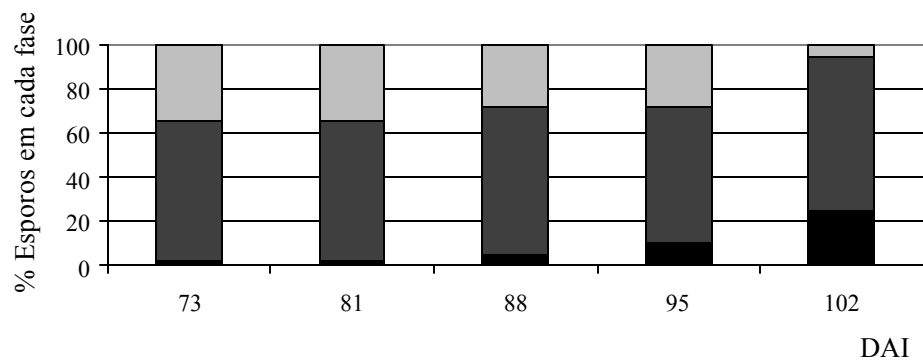


Figura 2 - Médias das porcentagens de esporos ocorrendo nos diferentes estádios de desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* parasitando plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com parte aérea (A) e após o corte da parte aérea (B), aos 73, 81, 88, 95 e 102 dias após inoculação (DAI).

A

CAMAPU COM PARTE AÉREA

**B**

SEM PARTE AÉREA

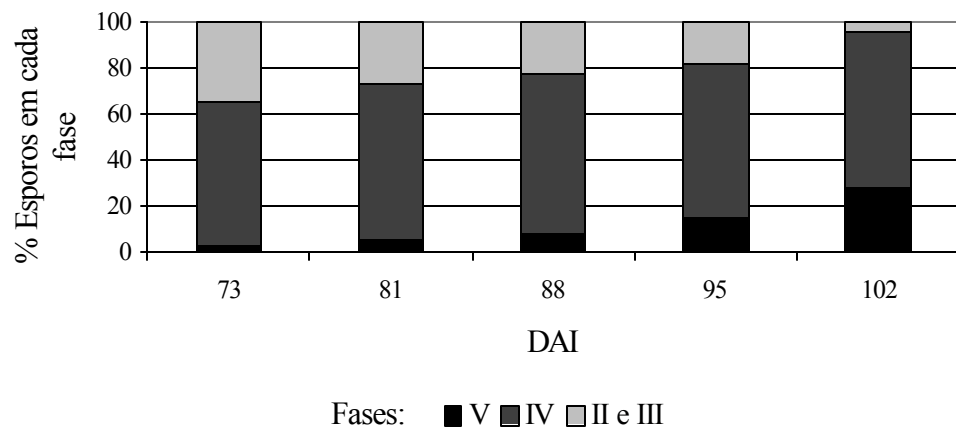
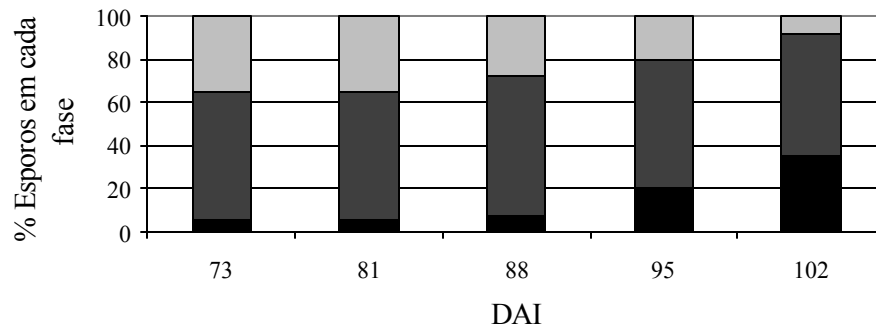


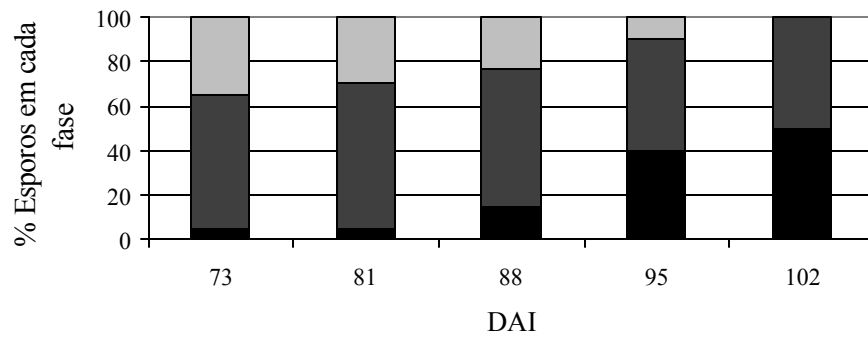
Figura 3 - Médias das porcentagens de esporos ocorrendo nos diferentes estádios de desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* parasitando plantas de camapu (*Physalis angulata*) com parte aérea (A) e após o corte da parte aérea (B), aos 73, 81, 88, 95 e 102 dias após inoculação (DAI).

A

TABACO COM PARTE AÉREA

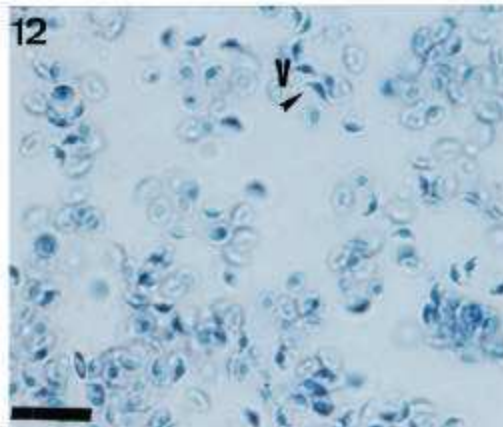
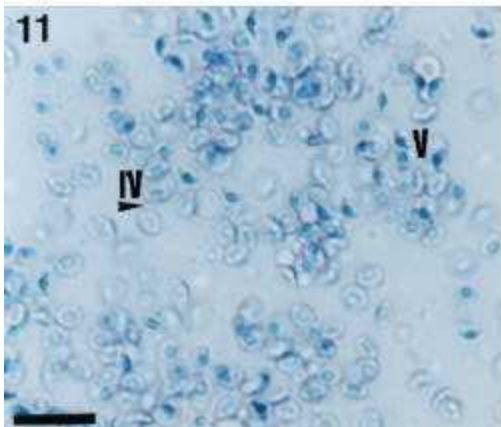
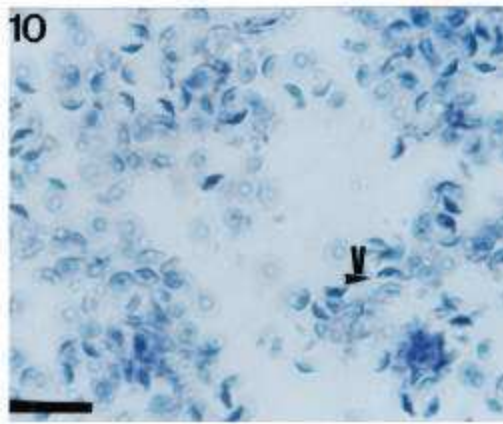
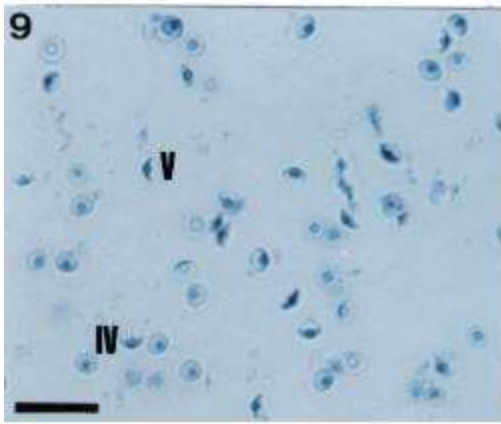
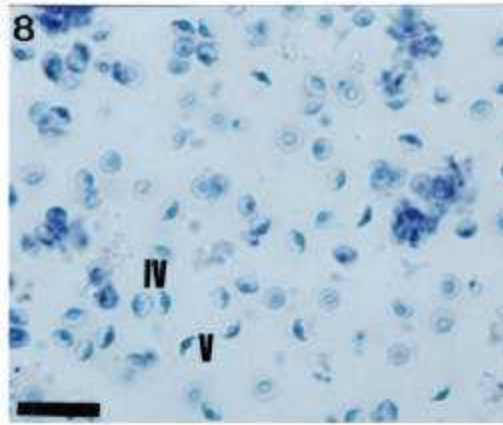
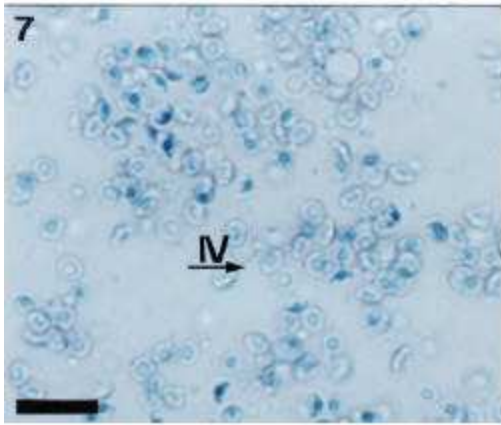
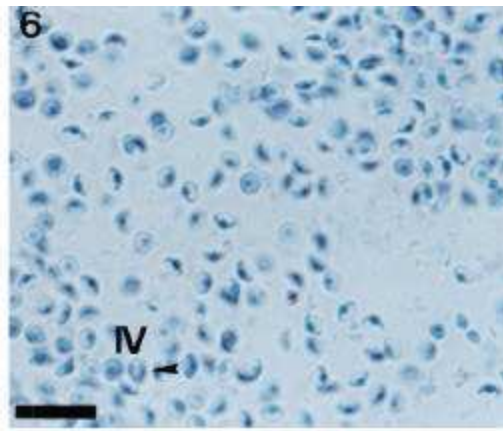
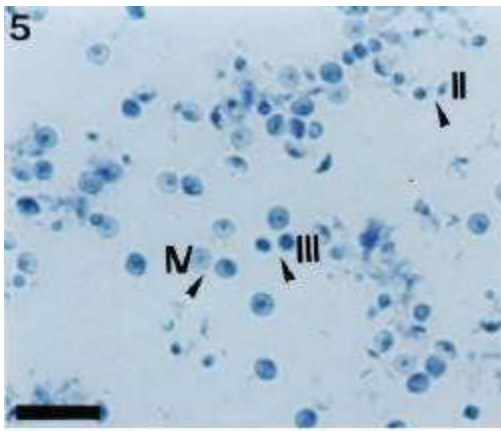
**B**

SEM PARTE AÉREA



Fases: ■ V ■ IV ■ II e III

Figura 4 - Médias das porcentagens de esporos ocorrendo nos diferentes estádios de desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* parasitando plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com parte aérea (A) e após o corte da parte aérea (B), aos 73, 81, 88, 95 e 102 dias após inoculação (DAI).



LITERATURA CITADA

- CAMPOS, V. P. 1992. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. In: MIRANDA, G. M. C. (ed). Informe Agropecuário. Belo Horizonte, EPAMIG, 16(172): 26-30.
- CHEN, Z. X. & D. W. DICKSON. 1997. Minimal growth temperature of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology, 29(4S):635-639 (Suplemento).
- DAVIES, K. G.; B. R. KERRY & C. A. FLYNN. 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. Annals of Applied Biology, 112: 491-501.
- DAVIES, K. G.; V. LAIRD & B. R. KERRY. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. Revue de Nématologie, 14: 611-618.
- DICKSON, D. W.; M. OOSTENDORP & D. J. MITCHELL. 1992. Development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria* race 1 in the field. In: GOMMERS, F. J. & P. W. Th. MAAS (eds). Nematology from molecule to ecosystem. Dundee, Scotland, European Society of nematologists, p. 213-218.
- DICKSON, D.W.; M. OOSTENDORP; R. M. GIBLIN-DAVIS & D. J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D.; F. D. BENNETT & J. L. CAPINERA (eds). Pest management in the subtropics. Biological control: A Florida perspective. Andover, Intercept Ltd., p.575-601.
- FREITAS, L. G.; D. J. MITCHELL & D. W. DICKSON. 1997. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1. Journal of Nematology, 29 (4): 547-555.
- GIANNAKOU, I. O.; B. PEMBROKE; S. R. GOWEN & S. DOULOUMPAKA. 1999. Effects of fluctuating temperatures and different host plants on development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology, 31 (3): 312-318.
- GOMES, C. B. ; L. G. FREITAS & L. G. O. TOMÉ. 1999. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras conduzidas em dois tipos de vasos. Fitopatologia Brasileira, 24(Suplemento): 345(Resumo).
- HATZ, B. & D. W. DICKSON. 1992. Effect of temperature on attachment, development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology, 24: 512-521.

- O'BRIEN, P. C. 1980. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology*, 12: 234 (abstr.).
- SASSER, J. N. & D. W. FRECKMAN. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A. & D. W. DICKSON (eds). *Vistas on Nematology*. Maryland, Society of Nematologists, p. 7-14.
- SAYRE, R. M. & M. P. STARR. 1985. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 52: 149-165.
- SERRACIN, M.; A. C. SCHUERGER; D. W. DICKSON & D. P. WEINGARTNER. 1997. Temperature-dependent development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 29(2): 228-238.
- STIRLING, G. R. & M. F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.
- STIRLING, G. R. 1981. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Nematologica*, 27: 458-462.
- STIRLING, G. R.; A. F. BIRD & A. B. CAKURS. 1986. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie*, 9: 251-260.
- WILLIAMS, J. R. 1960. Studies on the nematode soil fauna of sugarcane fields in Mauritius. Notes upon a parasite of root-knot nematode. *Nematologica*, 5: 37-42.
- WILLIAMS, A. B.; G. R. STIRLING; A. C. HAYWARD & J. PERRY. 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Applied Bacteriology*, 67:145-156.

CONCLUSÕES GERAIS

A bactéria *Pasteuria penetrans* tem-se mostrado muito promissora e com grande potencial no controle biológico, principalmente do nematóide das galhas, gênero *Meloidogyne*. Observaram-se os sítios de alimentação induzidos pelos nematóides e a relação deste fator com a produção e desenvolvimento de esporos de *P. penetrans*.

Verificou-se que a coloração quádrupla-triarca foi a mais conveniente para os estudos histopatológicos, entre as testadas, pois possibilitou distinção nítida de cores entre as colônias bacterianas, coradas pelo cristal violeta, e o conteúdo do corpo do nematóide das galhas.

A etapa primeira e imprescindível para o parasitismo, a adesão, é prejudicada quando os esporos não estão maduros e ainda envoltos no esporângio. No estudo da interação entre *Meloidogyne javanica* / *M. incognita* e da planta hospedeira na maturação de *P. penetrans*, os resultados mostraram que o desenvolvimento de *P. penetrans* foi semelhante nas duas espécies de nematóides, que apresentaram predominantemente esporos maduros, porém envoltos pelo esporângio (fase IV), o que prejudica a adesão e reduz a eficiência do inóculo bacteriano (O'Brien, 1980; Stirling et al., 1986). Esta semelhança no desenvolvimento bacteriano nestas duas espécies de nematóides é um indício de que os esporos do isolado usado, não apresentando elevada especificidade, aderiram-se e desenvolveram-se bem nas duas espécies de *Meloidogyne*. Tal fato concorda com Dickson e colaboradores (1994), que relataram que esporos de *P. penetrans* podem aderir-se a espécimes de diferentes populações, espécies e até mesmo gêneros de nematóides. Ao analisar o efeito da planta hospedeira no desenvolvimento de *P. penetrans*, observou-se que em maxixe este desenvolvimento é mais lento e desuniforme pois apresentou maior frequência de esporos nas fases II e III nas duas espécies estudadas de nematóides. Confirmando Stirling & Wachtel (1980), Davies et

al. (1988, 1991), Dickson et al. (1994), Freitas et al. (1997), Serracin et al. (1997), e Giannakou et al. (1999), os resultados mostraram que o tomateiro é de fato bom hospedeiro para a multiplicação de *Pasteuria* em *Meloidogyne*. Plantas inoculadas com *M. javanica* apresentaram maior frequência de esporos maduros. No camapu, observou-se maior homogeneidade de fases de desenvolvimento dos esporos, em plantas inoculadas com *M. incognita*, que tinham mais esporos maduros que plantas inoculadas com *M. javanica*.

No estudo do ciclo de vida de *P. penetrans* em população mista de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, pôde-se concluir que o melhor hospedeiro para a produção de *P. penetrans* foi o tomateiro, pela quantidade de esporos em fase V no final do ciclo. O camapu apresentou um bom resultado, com predomínio da fase IV mas com menor quantidade de esporos na fase V do que no tomateiro. O maxixe foi o hospedeiro que apresentou os piores resultados, pois quase não se verificaram esporos na fase V, além de muitos esporos nas fases iniciais II e III, mesmo no final do ciclo da cultura.

Nos cortes transversais de raízes de tomateiro, as células gigantes tinham aspecto normal, formato alongado e uniforme, geralmente em número de quatro a sete por fêmea de nematóide. No camapu, bem similar ao que se observou no tomateiro, a anatomia das células gigantes apresentava aspecto normal, estas eram uniformes e alongadas, quatro a sete por nematóide, com delimitações bem definidas de sua parede. No maxixe, as células gigantes eram deformadas e irregulares, os núcleos estavam agrupados, as suas paredes “internas” pareciam se dissociar, não sendo possível determinar o número de células por nematóide. Verificou-se correlação entre o desenvolvimento mais lento da bactéria no maxixe e a deformidade do sítio de alimentação do nematóide neste hospedeiro. No tomateiro e no camapu, correlacionou-se o melhor desenvolvimento da bactéria com a normalidade dos sítios de alimentação

Quando se compararam os efeitos entre plantas cortadas e não-cortadas, no estudo do estresse induzido no nematóide via hospedeiro, os resultados no tomateiro e no tabaco foram melhores do que no camapu e no maxixe porque naqueles foi encontrada maior proporção de esporos maduros, fases IV e V, do que nestes. Além disso, esporos imaturos não foram encontrados no tabaco e tomateiro.

Com predominância de esporos maduros, na fase IV, o camapu mostrou-se intermediário entre o tabaco/tomateiro e o maxixe. Este foi o pior hospedeiro dentre todos estudados, porque nele foi mais lento o desenvolvimento da bactéria e os esporos desta se apresentaram imaturos mesmo no final do ciclo do nematóide. Quando cortada a parte aérea, ocorreu, com todos os hospedeiros, redução no número de esporos

imaturos e aumento de esporos maduros (fase V). Isto é um indicativo de que o estresse na planta hospedeira pode acelerar o amadurecimento de *P. penetrans* no interior do nematóide, mas a espécie vegetal utilizada como hospedeira do nematóide é um fator mais importante para a redução do ciclo da bactéria.

Os dados do presente trabalho sugerem que o tomateiro e o camapu apresentam bom potencial para a multiplicação de *P. penetrans* em *Meloidogyne* spp., objetivando a produção do inóculo bacteriano a ser usado em controle biológico do nematóide das galhas. Indicam, ainda, que más hospedeiras do nematóide das galhas prolongam o ciclo de vida de *P. penetrans* possivelmente em decorrência de alterações nas células gigantes.

LITERATURA CITADA

- DAVIES, K. G.; B. R. KERRY & C. A. FLYNN. 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*, 112: 491-501.
- DAVIES, K. G.; V. LAIRD & B. R. KERRY. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Revue de Nématologie*, 14: 611-618.
- DICKSON, D. W.; M. OOSTENDORP; R. M. GIBLIN-DAVIS & D. J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D.; F. D. BENNETT & J. L. CAPINERA (eds). *Pest management in the subtropics. Biological control: A Florida perspective*. Andover, Intercept Ltd, p. 575-601.
- FREITAS, L. G.; D. J. MITCHELL & D. W. DICKSON. 1997. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Journal of Nematology*, 29 (4): 547-555.
- GIANNAKOU, I. O.; B. PEMBROKE; S. R. GOWEN & S. DOULOUMPAKA. 1999. Effects of fluctuating temperatures and different host plants on development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 31 (3): 312-318.
- O'BRIEN, P. C. 1980. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology*, 12: 234 (abstr.).
- SERRACIN, M.; A. C. SCHUERGER; D. W. DICKSON & D. P. WEINGARTNER. 1997. Temperature-dependent development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 29(2): 228-238.

- STIRLING, G. R. & M. F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.
- STIRLING, G. R.; A. F. BIRD & A. B. CAKURS. 1986. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie*, 9:251-260.

INSTRUÇÕES PARA A IMPRESSÃO DAS LEGENDAS:

- 1) Capítulo 1, legenda das figuras 1-6, imprimir no verso da página de n.º 21;
- 2) Capítulo 2, figuras 3-8, imprimir legenda no verso da pág. 34;
- 3) Capítulo 2, figuras 12-14 e 15, imprimir a legenda no verso da pág. 41;
- 4) Capítulo 3, figuras 5-12, imprimir a legenda no verso da página 57.

Figuras 1-6. Cortes transversais de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) parasitadas por *Meloidogyne*. 1-2. Coloração com azul de astra e fucsina básica. 1. Fêmeas adultas (Ne), na região do córtex, contendo colônias bacterianas de *Pasteuria penetrans* (Pp) no seu interior, e células gigantes (CG) bem desenvolvidas, no cilindro vascular. Barra = 100 µm. 2. Colônias de *P. penetrans* (Pp), não diferiram em cor das estruturas do corpo do nematóide (Ne). Barra = 10 µm. 3-4. Coloração com safranina, hematoxilina e orange G usando-se ácido tânico e cloreto férrico. 3. Fêmea adulta (Ne) associada às células gigantes (CG) bem desenvolvidas na região cortical. Barra = 100 µm. 4. Colônias de *P. penetrans* (CB) não diferiram em cor das estruturas internas do corpo do nematóide (Ne). Barra = 20 µm. 5-6. Coloração com safranina, cristal violeta, orange G e fast green (quádrupla-triarca). 5. Fêmeas adultas (Ne) associada às células gigantes (CG) bem desenvolvidas na região do córtex, colônias de *P. penetrans* (Pp) na região anterior do corpo do nematóide. Barra = 100 µm. 6. Colônias de *P. penetrans* (Pp) de coloração arroxeadas, diferindo da cor das estruturas do corpo do nematóide (Ne). Barra = 20µm.

Figuras 3-8. Esporos de *Pasteuria penetrans* obtidos de fêmeas de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* aos 67 dias após a inoculação. 3-4. Parasitando plantas de maxixe (*Cucumis anguria*). 3. Esporos na fase IV obtidos de *M. incognita*. 4. Esporos na fase IV obtidos de *M. javanica*. 5-6. Parasitando tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). 5. Esporos na fase IV em *M. incognita*. 6. Fase V em fêmeas de *M. javanica*. 7-8. Parasitando plantas de camapu (*Physalis angulata*). 7. Esporos nas fases IV e V em *M. incognita*. 8. Esporos na fase IV em *M. javanica*. Barra = 15 µm.

Figuras 12-14. Cortes transversais de raízes com fêmeas de *Meloidogyne* (Ne) parasitadas por colônias de *Pasteuria penetrans* (Pp), na porção anterior do corpo. 12-A, B. Tomateiro (*Lycopersicon esculentum*): células gigantes (CG) normais cujo protoplasma é pouco denso, com vários núcleos (n) e vacúolos (v). 13-A, B. Camapu (*Physalis angulata*): células gigantes (CG) normais bem desenvolvidas com protoplasma denso e vários núcleos (n) agrupados. 14-A, B. Maxixe (*Cucumis anguria*): células gigantes (CG) anormais com protoplasma denso e paredes “internas” dissociadas, com inúmeros núcleos (n) e vacúolos (v). Barra = 50 μ m.

15. Cortes transversais de raízes com fêmeas de *Meloidogyne* (Ne) parasitadas por *Pasteuria penetrans* (Pp). 15-A. Células gigantes bem desenvolvidas (CG), esporos de *P. penetrans* preenchendo todo o corpo do nematóide, disposto longitudinalmente no corte. 15-B. Esporos de *P. penetrans* (Pp) preenchendo o corpo do nematóide, cortado transversalmente. Barra = 50 μ m.

Figuras 5-12. Fotomicrografias de esporos de *Pasteuria penetrans* obtidos de fêmeas de *Meloidogyne* spp. aos 95 dias após a inoculação em diferentes espécies vegetais. 5-6. Parasitando maxixe (*Cucumis anguria*). 5. Plantas não cortadas (PNC) – esporos nas fases II, III e IV. 6. Plantas cortadas (PC) – esporos na fase IV. 7-8. Parasitando camapu (*Physalis angulata*). 7. PNC – fase IV. 8. PC – fases IV e V. 9-10. Parasitando tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). 9. PNC – fases IV e V. 10. PC – fase V. 11-12. Parasitando tabaco (*Nicotiana tabacum*). 11. PNC – fases IV e V. 12. PC – fase V. Barra = 15 µm.

