

VINÍCIUS ALENCAR JÚLIO

EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE FÊMEAS DE *Meloidogyne* spp. DE RAÍZES E SEUS EFEITOS NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES POR ELETROFORESE DE ISOENZIMAS E SOBRE *Pasteuria penetrans*

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
2004**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

J94e
2004

Júlio, Vinícius Alencar, 1977-

Extração enzimática de fêmeas de *Meloidogyne* spp.
de raízes e seus efeitos na identificação de espécies por
eletroforese de isoenzimas e sobre *Pasteuria penetrans*
/ Vinícius Alencar Júlio. – Viçosa : UFV, 2004.
ix, 49f. : il. ; 29cm.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas de fungos. 2. Eletroforese de isoenzimas.
3. *Meloidogyne* - Controle biológico. 4. *Pasteuria
penetrans* no controle de *Meloidogyne*. 5. Esporos
bacterianos - Efeito de enzimas de fungos. I. Univer-
sidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 20.ed. 632.4

VINÍCIUS ALENCAR JÚLIO

EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE FÊMEAS DE *Meloidogyne* spp. DE RAÍZES E SEUS EFEITOS NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES POR ELETROFORESE DE ISOENZIMAS E SOBRE *Pasteuria penetrans*

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: 23 de março de 2004.

Prof. Silamar Ferraz
(Conselheiro)

Prof^a. Rosângela D’Arc de Lima Oliveira
(Conselheira)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof. José Rogério de Oliveira

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

Concedei-nos senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos modificar. Coragem para modificar aquelas que podemos, e sabedoria para distinguir uma das outras.

(Oração da Serenidade).

A Deus.

Ao meus pais, Nélcio e Tânia.

Às minhas irmãs, Érica e Daiane.

À Alessandra.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante no dia-a-dia, dando-me forças para que eu pudesse vencer as barreiras ao longo desta jornada.

Aos meus pais, pelo esforço incansável e pelo apoio insaciável em mais esta etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós-Graduação.

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

Ao professor Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, pelo apoio e pela amizade ao longo desta caminhada.

Aos professores Silamar Ferraz, Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, Sebastião Tavares de Rezende e Jorge Luis Cavalcante Coelho, pelas informações e pelas sugestões, indispensáveis para a concretização deste trabalho.

Aos amigos Dagoberto Saunders de Oliveira, Daniel Luciano Falkoski, Everaldo Antônio Lopes e Marcelo Magalhães Coutinho, pelo apoio na realização deste trabalho.

À Alessandra, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho, pela compreensão e pela paciência.

Aos demais amigos do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides e aos amigos de turma.

À minha prima Aline Alencar Prates, pelo carinho e pelo companheirismo durante minha presença em Viçosa.

À tia Nilda, pelo carinho e pela amizade.

BIOGRAFIA

VINÍCIUS ALENCAR JÚLIO, filho de Nélcio Ferreira Júlio e Tânia Mary Alencar Júlio, nasceu em 15 de janeiro de 1977, em Montes Claros, Minas Gerais.

Em março de 2001, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais e iniciou o programa de aperfeiçoamento em Fitopatologia em 2001, no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides, sob orientação do Prof. Leandro Grassi de Freitas.

Em março de 2002, iniciou o programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, a nível de Mestrado, na área de Nematologia, na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
ARTIGO I	
Extração de Fêmeas de <i>Meloidogyne javanica</i> de Raízes de Tomateiro pela Maceração com Enzimas Fúngicas.....	12
RESUMO.....	12
SUMMARY	13
Introdução	13
Material e Métodos	15
Resultados e Discussão	17
Literatura Citada	20
ARTIGO II	
Efeito da Extração Enzimática de Fêmeas de <i>Meloidogyne</i> spp. na Identificação de Espécies por Eletroforese de Isoenzimas	23
RESUMO.....	12
Introdução	23
Material e Métodos	25
Resultados e Discussão	29
Literatura Citada	34

ARTIGO III	
Efeitos de Enzimas Fúngicas na Quantificação, Adesão e Reprodução de Endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i>	37
RESUMO	37
Introdução	37
Material e Métodos	39
Resultados e Discussão	41
Literatura Citada	46
CONCLUSÕES GERAIS	48

RESUMO

JÚLIO, Vinícius Alencar, MS., Universidade Federal de Viçosa, março de 2004.
Extração enzimática de fêmeas de *Meloidogyne* spp. de raízes e seus efeitos na identificação de espécies por eletroforese de isoenzimas e sobre *Pasteuria penetrans*. Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Conselheiros: Silamar Ferraz e Rosângela D’Arc de Lima Oliveira.

Extratos enzimáticos de diferentes fungos foram avaliados quanto à maceração de raízes, a fim de se extrair mais fácil e rapidamente fêmeas de *Meloidogyne* spp. para estudos de controle biológico e para a identificação de espécies por eletroforese de isoenzimas. Raízes de tomateiro infectadas por *Meloidogyne javanica* foram imersas em extrato enzimático produzidas pelos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium griseoroseum* ou *Penicillium italicum*, separadamente ou em mistura de 50% de enzimas de cada fungo, em combinações de dois a dois, ou em tampão fosfato (testemunha), e incubadas a 30°C/24h. As enzimas produzidas pelo fungo *P. griseoroseum* foram as mais eficientes na degradação da parede das células das raízes de tomateiro, equiparando-se às enzimas comerciais importadas, pectinase + celulase (Clarex, Miles do Brasil – 15.000 ajdv/g; Sigma Chemical Ltda- 5.000 un.), utilizadas para a extração de fêmeas de *Meloidogyne* spp. Raízes com galhas parasitadas com as espécies *M. incognita*, *M. javanica* ou *M. arenaria* foram imersas em tampão de acetato de sódio apenas ou com enzimas liofilizadas de *P. griseoroseum*, em diferentes concentrações, e incubadas a 40°C/24h. A atividade de 200 U/mL proporcionou maior liberação de fêmeas, e essas foram submetidas à eletroforese de isoenzimas. Não foram observadas bandas, em gel

de poliacrilamida, de fêmeas retiradas pela incubação em enzimas fúngicas, mas bandas foram vistas quando as fêmeas foram retiradas manualmente. Para avaliar o efeito das enzimas na adesão de endósporos aos juvenis de *M. javanica*, fêmeas foram retiradas manualmente e por maceração enzimática a 200 U/mL. Os endósporos de fêmeas extraídas por digestão enzimática apresentaram maior adesão a J2 de *M. javanica* em relação à testemunha. A reprodução dos endósporos de *P. penetrans* em fêmeas de *M. javanica* não foi afetada pela enzima. Para melhorar a quantificação de endósporos de *P. penetrans* em pó de raiz utilizado como inóculo para aplicação da bactéria no campo, as enzimas a 2% e 20% foram adicionadas a 2g do pó de raiz com *P. penetrans* e incubados a 40°C. O extrato enzimático na concentração de 20%, independente do tempo de incubação, possibilitou observar maior número de endósporos. O uso de enzimas fúngicas para a extração de fêmeas de *Meloidogyne* spp., demonstrou ser bastante eficiente e vantajoso, sem prejudicar a adesão e multiplicação de *P. penetrans* no nematóide; porém, não é recomendada para a identificação de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* por eletroforese de isoenzimas.

ABSTRACT

JÚLIO, Vinícius Alencar, MS., Universidade Federal de Viçosa, March 2004.
Enzimatic extraction of *Meloidogyne* spp. females from roots and it's effects on the species identification by isozime eletrophoresis and on *Pasteuria penetrans*.
Advisor: Leandro Grassi de Freitas. Committee members: Silamar Ferraz and Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.

Enzymatic extracts from different fungi were evaluated for root maceration as an easier and faster way of extracting *Meloidogyne* spp. females from roots, to be used in biological control studies and in species identification by isozyme electrophoresis. Tomato roots infected by *M. javanica* were immersed in enzymatic extracts produced by *Aspergillus niger*, *Penicillium griseoroseum* or *P. italicum*, separately or in mixtures of 50% of enzymatic extracts of each fungus, two by two, or in phosphate buffer (control), and incubated at 30°C/24h. The enzymes produced by the fungus *P. griseoroseum* were the most efficient in the degradation of the tomato root cell walls, being comparable to the imported commercial enzymes pectinase + cellulase (Clarex, Miles do Brasil – 15.000 ajdv/g; Sigma Chemical Ltda- 5.000 un.) used for *Meloidogyne* spp. females extraction. Galled roots parasitized by *M. incognita*, *M. javanica* or *M. arenaria* were immersed in sodium acetate buffer alone or with lyophilized enzymes of *P. griseoroseum* in different concentrations and incubated at 40°C/24h. The number of 200 U/mL of enzyme preparation provided the best female release, and the females attained using this concentration were subjected to isozyme electrophoresis analysis. No bands could be seen from the females extracted by

incubation in fungal enzymes, in the polyacrilamide gel, but typic bands formed from females extracted manually. In order to evaluate the effect of enzymatic extraction on the attachment of endospores on second-stage juveniles (J2) of *M. javanica*, nematode females parasitized with *Pasteuria penetrans* were extracted from the roots manually or by maceration in enzyme extract at 200 U/mL. The endospores from females extracted by enzymatic digestion attached in higher number to the *M. javanica* J2 when compared to the control treatment. The endospore production in *M. javanica* females was not affected by the enzymes. To improve the endospore counting in root powder used as carrier for field applications, the enzymes at 2% and 20% were added to 2g of root powder containing *P. penetrans* endospores, and incubated at 40 °C. The enzyme extract at 20%, independent of the incubation time, allowed to observe a higher number of endospores. The use of fungal enzymes to extract *Meloidogyne* spp. showed to be very efficient and advantageous, without disturbing attachment or reproduction of *P. penetrans* in the nematode, however, it is not recommended for the identification of *M. javanica*, *M. incognita* nor *M. arenaria* by isozyme electrophoresis.

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematóides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematóides das galhas, são considerados economicamente os mais importantes, por possuir ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros, com ocorrência em quase todas as partes do mundo (Sasser, 1980). A ação desses nematóides pode reduzir significativamente a produtividade e a qualidade dos produtos agrícolas, conferindo um aspecto desagradável aos olhos do consumidor, principalmente em olerícolas, como por exemplo tubérculos de batata, raízes de cenoura, vagens de amendoim, etc. (Hussey, 1985). Na cultura do tomate, as perdas provocadas por nematóide são responsáveis por 20,6% das perdas na cultura, o que equivale a 18 milhões de toneladas por ano no mundo (Sasser, 1989). As conseqüências geradas pelo ataque destes fitoparasitas podem ser danosas às plantas, tornando-as mais vulneráveis a outros fitopatógenos, além do estresse hídrico e nutricional. Os sintomas mais característicos em plantas atacadas por nematóides do gênero *Meloidogyne* aparecem nas raízes e tubérculos, que, quando infectados, engrossam no ponto de penetração do juvenil do segundo estágio (J2), originando as galhas típicas, refletindo no crescimento reduzido, diminuição na área foliar, deficiência nutricional e murchamento temporário durante o período mais quente do dia (Gonçalves *et al.*, 1995).

O gênero *Meloidogyne* possui mais de 80 espécies. Foi demonstrado que 95% dos prejuízos causados por espécies desse gênero à agricultura no mundo, são devido às espécies *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* (Sasser & Freckman, 1987).

As três espécies, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, são mais frequentes em regiões de clima quente, predominando nas regiões tropicais (Taylor & Sasser, 1978).

A identificação e a diagnose dessas espécies de *Meloidogyne* é dificultada pela variabilidade morfológica intra-específica, podendo ser explicada pelo modo de reprodução desses nematóides, variando de anfimixia à partenogênese facultativa ou obrigatória. Além da variabilidade, algumas espécies como *M. incognita*, possuem raças fisiológicas que diferem quanto à virulência a diversos hospedeiros (Carneiro *et al.*, 2000). Dentre os métodos empregados na diagnose estão a configuração perineal de fêmeas (Taylor & Netscher, 1974), morfologia da região perineal e estilete de juvenis de segundo estágio, gama de hospedeiros (Hartman & Sasser, 1985), características citogenéticas (Triantaphyllou, 1985), bioquímicas (Hussey *et al.*, 1972) e moleculares (Curran *et al.*, 1986).

A característica morfológica mais empregada na identificação de espécies do gênero *Meloidogyne* é a configuração perineal de fêmeas. Entretanto, essa característica é muito subjetiva, requer muita prática, mesmo para um profissional qualificado e especializado da área. Pode haver também o surgimento de populações com configurações da região perineal atípicas, além de que o grande número de espécies desse gênero dificulta sua utilização (Eisenback, 1985).

O método dos hospedeiros diferenciadores é empregado apenas para identificar as principais espécies do gênero *Meloidogyne* e suas raças fisiológicas. É considerado um método simples, confiável e de baixo custo, mas possui inconvenientes como requerer quantidades elevadas de inóculo demandar tempo para a multiplicação do inóculo e para a obtenção das mudas das espécies diferenciadoras, além de consumir muito espaço em casa de vegetação (Eisenback, 1985).

A utilização de características bioquímicas, tais como perfis protéicos e enzimáticos, foi adotada, primeiramente, para diferenciar nematóides por Dickson *et al.* (1970; 1971). No início, os extratos utilizados nos estudos de caracterização e identificação de fitonematóides eram obtidos da maceração de várias fêmeas. O gel de poliacrilamida usado por Dickson *et al.* (1970; 1971) foi adaptado por Bergé & Dalmaso (1975), para proteínas a partir do extrato de uma única fêmea. A redução do número de fêmeas, para a obtenção dos perfis enzimáticos proveniente de fêmeas individualizadas, tornaram a análise bioquímica mais valorizada nos trabalhos de identificação de espécies de *Meloidogyne* por profissionais da área. A eletroforese de isoenzimas apresenta várias vantagens, como a alta eficiência na diferenciação das

principais espécies, a identificação de populações atípicas, rapidez, custo relativamente baixo, avaliação da pureza de populações de nematóides das galhas mantidas em casa de vegetação e separação das espécies presentes num campo de produção quando em populações mistas (Carneiro *et al.*, 1996; 2000). Entretanto, possui limitações, como não permitir a separação de raças fisiológicas (Janati *et al.*, 1982) e requerer apenas fêmeas maduras para a identificação (Williamson *et al.*, 1997), além de identificar apenas 26 fenótipos de esterase das 80 espécies de *Meloidogyne* já descritas na literatura (Carneiro *et al.*, 2000). Contudo, Fargette (1987) concluiu que a identificação de *Meloidogyne* por eletroforese, é mais precisa e objetiva que outros critérios disponíveis, incluindo a configuração perineal.

Diversas enzimas foram detectadas em várias populações de *Meloidogyne* spp. (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985), sendo a esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase, as mais usadas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al.*, 1996; e 2000). Das isoenzimas citadas, o fenótipo de esterase tem sido o mais usado para a identificação de espécies de *Meloidogyne* (Dickson *et al.*, 1971).

A identificação das espécies de *Meloidogyne*, utilizando tanto o método morfológico quanto o método da eletroforese de isoenzimas, e as avaliações do parasitismo de *Pasteuria penetrans*, requerem a extração de fêmeas intactas no interior das galhas radiculares. Tal operação, feita à mão e com o auxílio de estilete e pinça, frequentemente resulta na ruptura da cutícula, extrusão do líquido pseudocelômico, dos órgãos internos do nematóide e dos microrganismos parasitantes. Portanto, a digestão enzimática dos tecidos das raízes é altamente desejável para a retirada de maior número de fêmeas intactas.

A parede celular dos vegetais é formada, basicamente, por três componentes estruturais: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é constituída principalmente por substâncias pécticas, que são polissacarídeos formados por longas cadeias de ácido D-galacturônico, e compreende a região localizada entre as paredes de células adjacentes, atuando como um adesivo intercelular. As paredes primárias e secundárias são formadas por celulose, hemicelulose e substâncias pécticas. Na parede secundária de células mais velhas, podem ser encontradas lignina e suberina. A hemicelulose, encontrada nas paredes secundárias, é composta por xilose, arabinose, glicose, manose e galactose (Ishii, 1981).

As pectinases, ou enzimas pectolíticas, são enzimas que degradam as substâncias pécticas constituintes da lamela média. As pectinases mais conhecidas são as poligalacturonases (PG), metilpoligalacturonases (MPG), transeliminase do ácido pectínico (TE), transeliminase do ácido poligalacturônico (TEPG) e metilesterase da pectina (MEP). Estas são as primeiras enzimas a serem produzidas durante o processo da penetração da parede celular e da morte da célula (Balley & Pessa, 1990).

A degradação ou extração da pectina, por ser um polissacarídeo estrutural das células vegetais, acarreta a desintegração dos tecidos por separação celular, resultando num processo denominado maceração (Balley & Pessa, 1990).

Em razão da grande diversidade de substâncias pécticas presentes em diferentes tecidos vegetais, existem várias enzimas capazes de degradar essas substâncias, que são denominadas enzimas pectinolíticas (Balley & Pessa, 1990). Estas enzimas são essenciais em processos de decomposição de material vegetal, propiciando sua utilização como fonte de energia por microrganismos saprófitos e, desse modo, atuando no processo de reciclagem de carbono para a biosfera (Alaña *et al.*, 1989). O complexo pectinolítico está também relacionado a algumas doenças em plantas, uma vez que, ao promover a degradação da parede celular, facilita processos de infecção por microrganismos patogênicos nos tecidos vegetais (Cervone *et al.*, 1987; Johnston & Williamson, 1992). Além da importância ecológica, as enzimas pectinolíticas são amplamente usadas em indústria de alimentos e têm potencial para serem utilizadas na indústria têxtil.

Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, apresentam atividades pectinolíticas elevadas (Fawole & Odunfa, 1992). Soares-Ramos (1996), demonstrou que o fungo *Penicillium griseoroseum* é um bom produtor de poligalacturonase. Estes fungos têm como modo de nutrição o saprofitismo, sendo detectada uma série de enzimas extracelulares que degradam diferentes polímeros. Considerando as várias aplicações tecnológicas das enzimas pécticas, a seleção de microrganismos adequados e a caracterização das diferentes enzimas pectinolíticas produzidas por estes, são de fundamental importância para a produção comercial de pectinases.

A celulose é um polímero linear constituído de resíduos de glicose, em ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Arakati, 1977), formando fibrilas que produzem uma estrutura amorfa e, ou, cristalina, que torna a celulose insolúvel na maioria dos solventes. A sua utilização como alimento ou energia, geralmente, depende do

rompimento dessas ligações através de tratamentos químicos ou enzimáticos, a fim de torná-la solúvel (Dekker & Richards, 1976), mas a celulose possui estrutura e configuração que dificultam sua hidrólise, oferecendo portanto, resistência a vários tratamentos enzimáticos (Tsao, 1986). A celulose quase sempre ocorre, na natureza, associada a outros polímeros como amido, pectina, hemicelulose e lignina.

As celulasas são produzidas por microorganismos capazes de utilizar a celulose como fonte de carbono. A biodegradação dos materiais celulósicos requer a participação de um complexo de celulasas de, pelo menos, três constituintes que atuam cooperativa e sinergisticamente: a) endo- β -1,4-D-glucanase (β -1,4-D-glucan glucohidrolase), conhecida comumente por carboximetilcelulase, que produz a celobiose como produto intermediários de sua ação; b) exo- β -1,4-D-glucanase (β -1,4-D-glucano e β -1,4-D-glucano glicohidrolase), que remove resíduos de celobiose e glicose dos terminais não-redutores da cadeia de celulose cristalina e derivados e c) β -D-glicosidase (β -D-glicoside glicohidrolase, ou celobiose), que hidrolisa celobiose à glicose (Whitaker, 1994). Sabe-se que a presença dos três grupos de enzimas é necessária para que ocorra a completa sacarificação da celulose e que estas enzimas, atuando separadamente, hidrolisam o polissacarídeo celulósico à açúcares solúveis com baixo grau de eficiência (Whitaker, 1994).

Muitas espécies de fungos são produtoras de celulasas, como *Penicillium funiculosum* Selby, *Aspergillus terreus* Garg & Neelakantan, *Phanerochaete chrysosporium* Eriksson & Petersson e *Sclerotium rolfsii* Shwale & Sadana. Entretanto, as melhores espécies produtoras são do gênero *Trichoderma*, particularmente *Trichoderma reesei* Mandels e a bactéria *Clostridium thermocellum* Saddler (Johnson *et al.*, 1982).

As hemicelulasas são enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose. O nome específico das enzimas depende do substrato hidrolizado, ou seja, a β -1,4 xiloglicana é hidrolizada por uma endoglucanase, a β -1,4 xilana é hidrolizada por endoxilanases e a xilobiose, por α -xilosidase (Whistler & Richards, 1970).

A xilana é a hemicelulose mais comum e o principal polissacarídeo não-celulósico largamente distribuído na natureza, situada na parede celular secundária (Thompson, 1983). A hidrólise da xilana requer, no mínimo, duas atividades enzimáticas: endo- β (1,4)-xilanaase, que hidrolisa ligações glicosídicas β -1,4 no interior da cadeia, produzindo oligossacarídeo com baixo grau de polimerização; e β -xilosidase,

que libera D-xilose de oligômeros de cadeia curta (Ozcan *et al.*, 1991). As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana (Dekker & Richards, 1976).

Inúmeros microrganismos estão envolvidos na produção do complexo enzimático xilanolítico, entre os quais os fungos são os mais relatados por secretarem maiores quantidades da enzima. Dentre estes, são citados *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. tamarisii*, *A. pulverulentus*, *Humicola* sp., *H. grisea*, *Penicillium canescens* e *Trichoderma reesei*. (Pham *et al.*, 1998).

Godoy & Rodrigues-Kábana (1983) extraíram fêmeas de *Meloidogyne arenaria* pela técnica de maceração enzimática, usando as enzimas comerciais pectinases, celulases e o antibiótico sulfato de estreptomicina, substituindo a técnica de obtenção de fêmeas de *Meloidogyne* em solução de sacarose.

O processo de parasitismo de *Pasteuria penetrans* (Thorne, 1940) Sayre & Starr, 1985, começa com a adesão do endósporo à cutícula do nematóide. Entretanto, esta fase de adesão sofre a influência de vários fatores abióticos (Sayre & Starr, 1985). Muitos estudos sobre a adesão de endósporos a nematóides foram realizados, mas segundo Ratnasoma & Gowen (1996), há pouco conhecimento sobre os fatores que envolvem a adesão. De acordo com Davies *et al.* (1992), a adesão dos endósporos à cutícula de fitonematóides varia em função do tipo e quantidade de proteínas presentes na superfície dos endósporos.

A natureza da superfície dos J2 e sua interação com os endósporos, é de fundamental importância para se entender a especificidade do nematóide hospedeiro com a bactéria (Davies & Danks, 1993). O mecanismo bioquímico que envolve a adesão de endósporos à cutícula dos nematóides não é um processo bem entendido, porém, parece provável que carboidratos presentes na superfície da cutícula dos nematóides reajam com moléculas de N-acetylglucosamina, presentes na superfície dos endósporos de *P. penetrans*, que são ligadas a outras proteínas ou peptidoglicanos que são extensão da parede celular da bactéria (Davies & Danks, 1993). Sugere-se que esta interação química entre o endósporo e a cutícula do nematóide possa ser prejudicada pela temperatura (Stirling *et al.* 1990), pois quando os endósporos são expostos ao calor, provavelmente ocorre a solubilização ou desnaturação de glicoproteínas ligadas a moléculas de N-acetylglucosamina ou moléculas similares (Freitas *et al.*, 1997).

Davies & Danks (1993) observaram que a pré-incubação de J2 em diferentes enzimas glicolíticas resultou em menor adesão de endósporos de *P. penetrans* à cutícula, quando comparados com aqueles incubados na solução tampão. Os autores também observaram em tratamento similar com pepsina, proteinase K, quimiotripsina e lipase, redução significativa na adesão dos endósporos, de 31 a 81%. Entretanto, a incorporação de 10 mM de CaCl₂ e 10 mM MgCl₂ na solução tampão, aumentou significativamente o número de endósporos aderidos à cutícula do nematóide. Maximiniano *et al.* (2001), ao estudarem o efeito da pectinase e celulase comercial na adesão de endósporos de *P. penetrans*, constataram que a pectinase-SIGMA P-9179, de *Aspergillus niger*, reduziu a adesão de endósporos de *P. penetrans* em juvenis do segundo estágio de *M. javanica*, o que não aconteceu com a celulase-SIGMA C-1184, permitindo supor que algum substrato promotor da ligação do endósporo a esse hospedeiro foi degradado pela pectinase, mas não pela celulase. Eles também estudaram o efeito do pré-tratamento dos endósporos e da concentração de pectinase-SIGMA 0,1% ou 1%, e observaram que endósporos de *P. penetrans*, incubados com *M. Javanica*, tiveram redução na adesão.

Em função do exposto, os objetivos desse trabalho foram:

- 1) Avaliar a ação de enzimas produzidas pelos fungos *Penicillium griseoroseum*, *P. italicum* e *Aspergillus niger*, na degradação da parede de células de raízes de tomateiro para liberação de fêmeas de *Meloidogyne javanica* intactas;
- 2) Estudar as possíveis alterações no padrão de bandas de esterase de fêmeas de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, extraídas das raízes de tomateiro por enzimas fúngicas;
- 3) Avaliar o efeito de enzimas fúngicas na determinação da concentração de endósporos de *Pasteuria penetrans* em pó de raiz;
- 4) Avaliar o efeito de enzimas sobre a adesão de endósporos de *P. penetrans* em juvenis do segundo estágio de *M. javanica*; e
- 5) Avaliar o efeito de enzimas na reprodução de endósporos de *P. penetrans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAHÑA, A., GABILONDO, A., HERNANDO, F. Pectin lyase production by *Penicillium italicum* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1612-1616. 1989.
- ARAKATI, T. Produção de enzimas celulolíticas. **Boletim Technology**, v.49, p.33-44. 1977.
- BAILEY, M.J., PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technol.**, v.12, p.266-271. 1990.
- BERGÉ, J.B., DALMASSO, A. Caracteristiques biochimiques de quelques populations de *Meloidogyne* spp. **Cahiers Orstom Ser. Biol**, v.10, p.263-271. 1975.
- CARNEIRO, R.M.D.G., ALMEIDA, M.R.A., QUÉNHERVE, P. Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v.2, p.645-654. 2000.
- CARNEIRO, R.M.D.G., CARNEIRO, R.G., ABRANTES, I.M.O., SANTOS, M.S.N.A., ALMEIDA, M.R.A. *Meloidogyne paranaensis* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee Brazil. **Journal of Nematology**, v.28, p.177-189. 1996.
- CERVONE, F., DE LORENZO, G., DEGRÀ, L. Elicitation of necrosis in *Vigna unguiculata* Walp. by α -D-galacturonase oligomers. **Plant Physiology**, v.85, p.626-630. 1987.
- CURRAN, J., MCCLURE, M.A., WEBSTER, J.M. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. **Journal of Nematology**, v.18, p.83-86. 1986.

- DAVIES, K.G., ROBINSON, M.P., LAIRD, V. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.59, p.18-23. 1992.
- DAVIES, K.G., DANKS, C. Carbohydrate/protein interaction and purification between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.39, p.53. 1993.
- DEKKER, R.F.H., RICHARDS, G. Hemicellulose: their occurrence purification, properties and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.32, p.277-352. 1976.
- DICKSON, D.W., SASSER, J.N., HUISINGH, D. Comparative disc-electrophoretic protein analyses of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, and *Aphelenchus* spp. **Journal of Nematology**, v.2, n.4, p.286-293. 1970.
- DICKSON, D.W., HUISINGH, D., SASSER, J.N. Deshydrogenase, acid and alkaline phosphatase and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. **Journal of Nematology**, v.1, p.1-16. 1971.
- EISENBACK, J.D. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) In: SASSER, J.N., CARTER, C.C. (Eds.) **An advanced treatise on Meloidogyne**. North Carolina: North Carolina State University. v.1, 1985. p.95-112.
- ESBENSHADE, P.R., TRIANTAPHYLLOU, A.C. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematode enzymes. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C., SASSER, J.N. (Eds.) **An advanced treatise on Meloidogyne**. North Carolina State University Graphics, 1985. p.115-123.
- FARGETTE, M. Use of the esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. II Esterase phenotypes observed in West African populations and their characterization. **Revue de Nematologie**, v.10, p.45-56. 1987.
- FAWOLE, O.B., ODUNFA, S.A. Pectolytic moulds in Nigeria. **Applied Microbiology**, v.15, p.266-268. 1992.
- FREITAS, L.G., MITCHELL, D.J., DICKSON, D.W. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1. **Journal of Nematology**, v.29, n.4, p.547-555. 1997.
- GODOY, G., RODRIGUES-KÁBANA, R. An enzymatic technique for obtaining *Meloidogyne* females for biological control studies. **Nematropica**, v.13, n.1, p.75-78. 1983.
- GONÇALVES, W., MAZZAFERA, P., FERRAZ, L.C.C.B., SILVAROLLA, M.B., LIMA, M.M.A. Biochemical basis of coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita*. **Plantation Recherche Development**, v.2, p.54-60. 1995.

- HARTMAN, K.M., SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R., SASSER, J.N. (Eds.) **An advanced treatise on *Meloidogyne***. North Carolina: North Carolina State University, v.2, 1985. p.69-77.
- HUSSEY, R.S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: SASSER, J.N., CARTER, C.C. (Eds.) **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Biology and control. Raleigh. North Carolina. State University Graphics. v.1, 1985. p.143-153.
- HUSSEY, R.S., SASSER, J.N., HUISINGH, D. Disc-electrophoretics studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **Journal of Nematology**, v.4, p.183-189. 1972.
- ISHII, S. Isolation and characterization of cell-wall pectic substances from potato tuber. **Phytochemistry**, v.20, p.2329-2333. 1981.
- JANATI, A.A., BERGÉ, J.B., TRIANTAPHYLLOU, A.C., DALMASSO, A. Nouvelles données sur utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*. **Revue de Nématologie**, v.5, p.147-154. 1982.
- JOHNSON, E.A., SAKAJOH, N.G., HALLIWEL, G., MADIA, A., DEMAIN, A.L. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulases system from *Clostridium thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.5, p.1125-1132. 1982.
- JOHNSTON, D.J., WILLIAMSON, B. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. **Mycologia**, v.96, p.343-349. 1992.
- MAXIMINIANO, C., CAMPOS, V.P., SOUSA DE, R.M. Efeitos de enzimas na adesão de endósporos, e de raças de *Meloidogyne incognita* na infectividade de *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, v.25, n.1, p.27-34. 2001.
- OZCAN, S., KOTTER, P., CIRIACY, M. Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast. *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.190-195. 1991.
- PHAM, P.L., TAILLANDIER, P., DELMAS, M., STREHAIANO, P. Optimization of a culture medium for xylanase production by *Bacillus* sp. using statical experimental designs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p.185-190. 1998.
- RATNASOMA, H.A., GOWEN, S.R. Spore attachment of *Pasteuria penetrans* on juvenis of *Meloidogyne incognita* as affected by pH and organic matter. **Nematologia Mediterranea**, v.24, n.2, p.283-285. 1996.
- SASSER, J.N. Root-knot nematode; a global menace to crop production. **Plant Disease**, v.64, p.36-41. 1980.

- SASSER, J.N., FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology: The rule of the society. In: WEECH, J., DICKSON, D.W. (Eds.) **Vistas on Nematology: a commemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists**. Hyatsville. The Society of Nematologists, 1987. p.7-14.
- SAYRE, R.M., STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. ver., com. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.52, n.2, p.149-165. 1985.
- SOARES-RAMOS, J.R.L. Atividade poligalacturonase produzida por *Penicillium griseoroseum* (Tese). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 39 p. 1996.
- STIRLING, G.R., SHARMA, R.D., PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* spore to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. **Nematologica**, v.36, p.246-252. 1990.
- TAYLOR, A.L., NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, v.20, p.268-269. 1974.
- TAYLOR, A.L., SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-Knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. International *Meloidogyne* Project, Raleigh, North Carolina State University/ United States Dept. Agric. 1978.
- THOMPSON, N.S. Hemicellulose as biomass resource. In: SOLTS, J. (Ed.) **Wood and agricultural residues; research on use for feed, fuels and chemicals**. New York. Academic Press, 1983. p.101-114.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. Cytological methods for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematodes. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C., SASSER, J.N. (Eds.) **An advanced treatise on *Meloidogyne***. North Carolina State University Graphics. 1985. p.107-114.
- TSAO, G.T. Structures of cellulosic materials and their hydrolysis by enzymes. In: ALANI, D.I., MOON-YOUNG, M. (Eds.). **Perspectives in biotechnology and applied microbiology**. Elsevier Applied Science Publishers, London, 1986. p.205-212.
- WHISTLER, R.L., RICHARDS, E.L. **The carbohydrates chemistry and biochemistry**. In: A. Press (Ed.) New York Pigman, W. Horton, D. 1970. p.447-469.
- WHITAKER, J.R. Principles of enzymology for the food sciences. **Food Science and Technology**, v.61, p.414-416. 1994.
- WILLIAMSON, V.M., SAWELL-CHEN, E.P., WESTERDAHL, B.B., WU, F.F., CARYL, G.A. PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. **Nematology**, v.29, p.9-15. 1997.

ARTIGO I

Extração de Fêmeas de *Meloidogyne javanica* de Raízes de Tomateiro pela Maceração com Enzimas Fúngicas

RESUMO

Avaliou-se a eficiência das enzimas produzidas pelos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium italicum* na degradação de raízes de tomateiro, para liberação de fêmeas inteiras de *Meloidogyne javanica*. Raízes de tomateiro infectadas por *M. javanica* foram imersas nas enzimas produzidas por cada fungo, separadamente, em mistura de 50% de enzimas de cada fungo, em combinações de dois a dois ou em tampão K_2HPO_4 (testemunha), e incubadas a 30°C por 24 h. A seguir, as raízes submetidas aos diferentes tratamentos foram colocadas sob jato forte de água de torneira e friccionadas levemente, com os dedos, sobre peneiras de 0,850 mm e 0,105 mm de abertura de malha, acopladas, para a liberação das fêmeas. As enzimas produzidas pelo fungo *P. griseoroseum* foram as mais eficientes na degradação da parede das células das raízes de tomateiro, equiparando-se às enzimas comerciais importadas quanto a sua eficiência para extração de fêmeas do nematóide. As atividades enzimáticas obtidas por *P. griseoroseum* foram: xilanase, 2,42 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mL}^{-1}$; pectinase, 1,23 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ e celulase, 0,05 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Degradação enzimática, extração, pectinase, celulase, xilanase, *Meloidogyne javanica*, *Aspergillus niger*, *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium italicum*.

SUMMARY

Extraction of *Meloidogyne javanica* females from tomato roots through maceration with fungal enzymes

The efficiency of the enzymes produced by *Aspergillus niger*, *Penicillium griseoroseum*, and *Penicillium italicum* was evaluated through maceration of tomato roots for the recovery of *Meloidogyne javanica* females. Tomato roots infected by *M. javanica* were placed in the enzymes produced by each fungus in separate or in a mixture of 50% of enzymes of each fungus, combined two by two, or in K₂HPO₄ buffer (control treatment), and incubated at 30 °C for 24 h. The softened roots were retained onto a 0,850 mm (20 “mesh”) sieve over a 0,105 mm (100 “mesh”) sieve and subjected to a high-pressure tap water spray and to a light finger rubbing to dislodge the females. The enzyme produced by the fungus *P. griseoroseum* was the most efficient in degrading the tomato root cell walls, being comparable to commercial enzymes. The enzymatic activities from *P. griseoroseum* were: xylanase, 2,42 μmoles min⁻¹ mL⁻¹; pectinase, 1,23 μmoles min⁻¹ mL⁻¹, cellulase, 0,05 μmoles min⁻¹ mL⁻¹.

Key-words: Enzymatic degradation, extraction, pectinase, cellulase, xylanase, *Meloidogyne javanica*, *Aspergillus niger*, *Penicillium griseoroseum* and *Penicillium italicum*.

Introdução

O nematóide das galhas, *Meloidogyne* spp., constitui o grupo de fitonematóides de maior importância econômica em todas as regiões do globo. Suas espécies estão amplamente distribuídas e atacam quase todas as plantas cultivadas, causando perdas consideráveis na produção e afetando a qualidade dos produtos (Sasser & Kirby, 1979).

O controle biológico de *Meloidogyne* spp. vem sendo estudado há alguns anos, com ênfase no parasitismo de fêmeas do nematóide pela bactéria *Pasteuria penetrans* e por fungos, como *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*. As avaliações do parasitismo requerem a extração de fêmeas intactas do interior das galhas radiculares. Tal operação, feita manualmente com o auxílio de estiletos e bisturis, freqüentemente resulta na ruptura da cutícula e extrusão do fluido pseudocelômico dos

órgãos internos e dos microrganismos parasitantes de fêmeas. Portanto, a digestão enzimática dos tecidos das raízes é altamente desejável para a retirada de maior número de fêmeas intactas.

A lamela média, situada entre as paredes primárias celulares, é constituída principalmente por substâncias pécticas que atuam como adesivo intercelular (Ishii, 1981). As pectinases, ou enzimas pectinolíticas, são enzimas que degradam as substâncias pécticas constituintes da lamela média e são as primeiras enzimas a serem produzidas durante o processo da penetração da parede celular, principalmente por fungos, acarretando a morte da célula. Por serem polissacarídeos estruturais das células vegetais, a degradação das pectinas acarreta a desintegração dos tecidos por separação celular, resultando num processo de maceração. A xilana é a hemicelulose mais comum da parede celular secundária e o principal polissacarídeo não-celulósico largamente distribuído na natureza (Biely, 1985). A hidrólise da xilana requer, no mínimo, duas atividades enzimáticas: endo- β (1,4)-xilânase, que hidrolisa ligações glicosídicas β -1,4 no interior da cadeia, produzindo oligossacarídeo com um baixo grau de polimerização; e β -xilosidase, que libera D-xilose de oligômeros de cadeia curta (Ozcan *et al.*, 1991). Inúmeros microrganismos estão envolvidos na produção do complexo enzimático xilanolítico, entre os quais, os fungos são os mais relatados por secretarem maiores quantidades da enzima. Dentre estes, são citados *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. tamarii*, *A. pulverulentus*, *Humicola* sp., *H. grisea*, *Penicillium canescens* e *Trichoderma reesei* (Pham *et al.*, 1998). A celulose quase sempre ocorre na natureza associada a outros polímeros como amido, pectina, hemicelulose e lignina e possui estrutura e configuração que dificultam sua hidrólise, uma vez que oferecem resistência a vários tratamentos enzimáticos (Tsao, 1986). As celulasas, enzimas envolvidas na degradação da celulose, são produzidas por microorganismos capazes de utilizar a celulose como fonte de carbono (Wood & McCrae, 1986). Muitas espécies de fungos são produtoras de celulasas, como *Penicillium funiculosum* (Selby, 1968), *Aspergillus terreus* (Garg & Neelakantan, 1982), *Phanerochaete chrysosporium* (Eriksson & Petersson, 1975) e *Sclerotium rolfsii* (Shawale & Sadana, 1978).

A extração de grande quantidade de fêmeas de *Meloidogyne* sp. das raízes por digestão enzimática, foi desenvolvida por Dropkin e colaboradores (1960) e utilizada, posteriormente, por Dickson *et al.* (1970) e Hussey (1971), para estudos bioquímicos. Mais recentemente, esta técnica vem sendo utilizada para estudos de controle biológico

do nematóide das galhas pela bactéria *Pasteuria penetrans* (Freitas *et al.*, 1997; Souza & Campos, 1998; Carneiro *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). Chen *et al.* (2000) utilizaram a enzima citolase para digerir raízes de tomateiro para a liberação de fêmeas de *M. arenaria* parasitadas por *P. penetrans*, com o objetivo de quantificar endósporos de *P. penetrans*. Souza & Campos (1998) testaram vários métodos (maceração, diluição e digestão enzimática) para a quantificação do número de endósporos misturados ao pó de raiz, e observaram que o método de digestão enzimática de uma solução de 2% de pectinase-celulase (Sigma Chemicals Ltda), por 3 horas a 37°C, permitiu detectar mais endósporos/g de raiz que os demais métodos.

Até o presente momento, as enzimas pectinase e celulase não são produzidas comercialmente no Brasil. A importação envolve custos elevados e empecilhos burocráticos, gerando limitações no seu uso rotineiro em análises de diagnose, para determinação de espécies de *Meloidogyne* baseadas em caracteres morfológicos ou bioquímicos, ou como componente auxiliar em pesquisas nematológicas, de forma geral. Desta forma, teve-se por objetivo neste trabalho, comparar a ação de enzimas produzidas pelos fungos *Penicillium griseoroseum*, *P. italicum*, *Aspergillus niger* e mistura delas na liberação de fêmeas de *M. javanica* de raízes de tomateiro.

Material e Métodos

1- Produção de inóculo para obtenção de fêmeas de *M. javanica*

Mudas de tomateiro cv. Kada com aproximadamente 10 cm de altura, foram transplantadas para vasos de 4 L de capacidade, uma por vaso, contendo uma mistura de solo e areia na proporção 1:1 (v:v), previamente desinfestada com brometo de metila. Um dia após o transplante, cada muda foi inoculada com, aproximadamente, 1.500 ovos de *M. javanica*. Após 50 dias da inoculação, as raízes foram retiradas do solo, separadas da parte aérea do tomateiro e lavadas para posteriormente, serem submetidas ao processo de extração enzimática das fêmeas do nematóide (item 4).

2- Produção de enzimas pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas

Os fungos *Penicillium italicum*, *P. griseoroseum* e *Aspergillus niger*, utilizados nos experimentos, foram isolados em laboratório a partir de sementes de plantas florestais e cultivados em meio ágar-aveia (40 g L⁻¹ de farinha de aveia e

15 g L⁻¹ de ágar-ágar) em tubos inclinados a 26°C, por sete dias, para a produção do inóculo. Suspensões aquosas dos diferentes fungos foram obtidos através da adição de 10 mL de solução Tween 80 a 4% à superfície do meio e sua raspagem com alça de platina. A suspensão de esporos na concentração de 2x10⁸ esporos/mL foi adicionada ao meio mineral [6,02 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 20 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e 10 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O], pH 7,2 e a extrato de levedura 6% (p/v). O meio mineral, o MgSO₄, o extrato de levedura e o farelo de trigo foram esterilizados separadamente em autoclave a 121°C por 30 min. Para a produção de enzimas, cultivaram-se os fungos em 50 mL de meio mineral e 50 g de farelo de trigo, em Béquer de 500 mL em incubadora a 26°C por oito dias, sem agitação. Após esse período, 200 mL de água destilada estéril foram adicionados a cada frasco. A mistura foi agitada em agitador orbital a 150 rpm, em temperatura ambiente de laboratório por 30 min, separando-se a enzima bruta do meio de cultura através de filtração, utilizando-se saco de náilon de 400 malhas/polegada quadrada.

3- Determinação da atividade enzimática

As enzimas produzidas pelos fungos *A. niger*, *P. griseoroseum* e *P. italicum*, bem como as combinações 1:1 (v:v) de enzimas produzidas por *A. niger* + *P. griseoroseum*, *A. niger* + *P. italicum* e *P. griseoroseum* + *P. italicum*, foram avaliadas de acordo com Haltrich *et al.* (1993), perfazendo seis tratamentos com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Para determinar a atividade de xilanase, utilizou-se como substrato, xilana “oat spelt” (Sigma) 1% (p/v) diluída em tampão-fosfato 50 mM, pH 5,5 a 60°C. A mistura de reação, constituída de 1,5 mL de substrato e de 0,5 mL do filtrado da cultura, foi incubada por 30 min, a 40°C, exceto para celulase. Uma alíquota de 250 µL dessa mistura foi adicionada a tubos de ensaio, contendo 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico, DNS (Miller, 1959) e 750 µL de água destilada. Utilizou-se xilose para confecção da curva-padrão.

A atividade de pectinase foi realizada como a de xilanase, substituindo-se o substrato por ácido poligalacturônico 1,2% (p/v), diluído em tampão acetato de sódio 100 mM e solução de NaCl 100 mM, pH 4,8. Os grupos redutores produzidos foram quantificados pelo método DNS (Miller, 1959), usando-se ácido galacturônico para confecção da curva-padrão.

Determinou-se a atividade de celulase pela formação de açúcar redutor, empregando-se o método de Haltrich *et al.* (1993), utilizando-se glicose como padrão. O substrato utilizado foi papel-filtro Whatman N^o 1, recortado em círculos de 5 mm de diâmetro. A reação procedeu-se da seguinte maneira: nos tratamentos testemunhas, dois círculos de papel e 400 µL de cada enzima foram colocadas, separadamente, por tubo de ensaio, retirando-se imediatamente, uma alíquota de 250 µL para dosagem com 1 mL de DNS e 750 µL de água destilada; já nos tubos de reação, os círculos de papel juntamente com a enzima, foram incubados a 40°C por 16 h. Decorrido esse período, uma alíquota de 250 µL foi retirada e acrescida de 1mL de DNS e 750 µL de água destilada, para posterior dosagem.

4- Extração de fêmeas de *Meloidogyne javanica* por maceração enzimática de raízes de tomateiro

Lotes de cinco seções de 10 cm de comprimento de raízes de tomateiro com galhas foram imersas em 25 mL de cada enzima produzida separadamente, da combinação delas (item 2), de solução das enzimas comerciais pectinase (Clarex, Miles do Brasil, 15.000 ajdv/g) e celulase (Sigma Chemical Ltda., 5.000 unidades), utilizando-se 0,125 g de cada em 25 mL de água destilada estéril, ou de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 5, em tubos plásticos de centrífuga de 50 mL de capacidade. Os tubos foram fechados e incubados no escuro a 30°C por 24 h. Após esse período, as raízes foram colocadas sobre peneira de 0,850 mm de abertura de malha (20 ‘mesh’) acoplada sobre outra de 0,150 mm (100 ‘mesh’), submetidas a jato forte de água de torneira e leve fricção com os dedos para a liberação das fêmeas do nematóide. As que ficaram retidas na peneira de 0,150 mm foram transferidas para placas de Petri e contadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio. O experimento foi repetido, sendo os dados analisados através do programa estatístico SAEG (Euclides, 1983) e as médias comparadas pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Das três enzimas fúngicas estudadas e combinações delas, produzidas pelos fungos *P. griseoroseum*, *P. italicum* e *A. niger*, a celulase sempre apresentou menor atividade; porém, maior quantidade dessa enzima foi produzida por *P. griseoroseum*

(Tabela 1). A xilanase produzida pelas três espécies fúngicas, em separado ou em combinações, apresentou maior atividade em relação às demais enzimas, e foi produzida em maior quantidade por *P. griseoroseum* e *A. niger* (Tabela 1). A mistura de enzimas produzidas por *P. griseoroseum* com as produzidas por *P. italicum* reduziu ($P \leq 0,05$) a atividade de xilanase (Tabela 1). A pectinase apresentou grau de atividade entre a celulase e a xilanase, entretanto, a pectinase produzida por *P. griseoroseum*, separadamente ou em mistura com a produzida por *P. italicum* ou *A. Niger*, foi mais ativa que a produzida por *P. italicum*, separadamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção de pectinases totais, xilanas e celulasas por *Penicillium griseoroseum*, *P. italicum* e *Aspergillus niger* e combinações, crescidos por oito dias em farelo de trigo, meio mineral e extrato de levedura¹.

Espécies de fungos	Média de produção das enzimas($\mu\text{moles min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) ²		
	Pectinase	Xilanase	Celulase
<i>P. griseoroseum</i>	1,23 ab	2,42 a	0,05 a
<i>P. italicum</i>	0,71 c	1,52 b	0,02 b
<i>A. niger</i>	0,84 bc	1,80 ab	0,01 b
<i>P. griseoroseum</i> + <i>P. italicum</i>	1,09 abc	1,75 bc	0,01 c
<i>P. griseoroseum</i> + <i>A. niger</i>	1,44 a	2,18 ab	0,01 bc
<i>A. niger</i> + <i>P. italicum</i>	0,85 bc	1,42 b	0,02 b
C.V. (%)	15,76	16,24	36,04

¹ Atividade de pectinase, xilanase e celulase, determinadas nos substratos pectina, xilana e papel-filtro, respectivamente. ² Média de três repetições, seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

A liberação de fêmeas foi maior com o uso de enzimas que apenas tampão fosfato de potássio (Tabela 2). No primeiro experimento, o número de fêmeas de *M. javanica* liberadas quando se usou filtrados de *P. griseoroseum*, foi igual ($P \leq 0,05$) ao da pectinase comercial (Tabela 2). A liberação de fêmeas foi maior ($P \leq 0,05$) quando se usou *P. griseoroseum* isoladamente que *P. italicum* ou *A. niger*, separadamente, no segundo experimento. Embora não-significativo estatisticamente,

Tabela 2 - Fêmeas de *Meloidogyne javanica* liberadas após o tratamento com enzimas despolimerizantes da parede celular de raízes de tomateiro por 24 horas¹.

Tratamento	Nº de fêmeas de <i>M. javanica</i> livres*	
	1º Experimento	2º Experimento
Celulase (enzima comercial)	99,0 a	235,4 a
Pectinase (enzima comercial)	74,0 b	196,2 ab
<i>P. griseoroseum</i>	61,2 bc	229,4 a
<i>P. italicum</i>	52,6 c	134,6 bc
<i>A. niger</i>	54,0 c	140,2 bc
<i>P. griseoroseum</i> + <i>P. italicum</i>	42,4 c	157,4 ab
<i>P. griseoroseum</i> + <i>A. niger</i>	52,0 c	195,8 ab
<i>A. niger</i> + <i>P. italicum</i>	42,4 c	133,2 bc
Tampão fosfato (testemunha)	15,2 d	103,0 c
C.V. (%)	25,3	33,1

¹ Média de cinco repetições.

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

houve tendência de menor liberação de fêmeas de *M. javanica* quando se usou mistura de enzimas, comparado com enzimas usadas separadamente, o que colabora com menor atividade enzimática após mistura de filtrados de diferentes fungos (Tabelas 1 e 2). Por outro lado, a diminuição da atividade enzimática quando as enzimas produzidas por diferentes fungos foram misturadas, é bem correlacionada com a menor liberação de fêmeas de *M. javanica* (Tabelas 1 e 2).

A parede celular é formada basicamente por três componentes estruturais: lamela média, parede primária e parede secundária (Ishii, 1981). Como a xilana está situada na parede celular primária em maior abundância, a xilanase, produzida em maior quantidade pelo fungo *P. griseoroseum*, pode ter contribuído com a maior liberação de fêmeas. Apesar de *P. griseoroseum* produzir mais celulase que os outros fungos, a atividade destas enzimas foi muito baixa e, portanto, acredita-se que sua participação na maceração das raízes foi mínima.

Em razão da grande diversidade de substâncias pécnicas presentes em diferentes tecidos vegetais, existem várias enzimas pectinolíticas capazes de degradá-las (Bailey & Pessa, 1990). Soares-Ramos (1996) demonstrou que o fungo *P. griseoroseum* é bom produtor de enzimas pectinolíticas, e este fato confirma a maior liberação de

fêmeas de *M. javanica* e com a maior quantidade de enzimas produzidas por *P. griseoroseum* nesse trabalho. Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium* e *Rhizopus*, apresentam atividades pectinolíticas elevadas (Fawole & Ondunfa, 1992). Considerando as várias aplicações tecnológicas das preparações de enzimas pectinase, xilanase e celulase, a seleção de microrganismos adequados e a caracterização das diferentes enzimas são de fundamental importância para a produção comercial destas. Portanto, o fungo *P. griseoroseum* apresentou um bom potencial para tal finalidade.

Literatura Citada

- BAILEY, M.J. & PESSA, E. 1990. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbial Technol.* 12: 266-271.
- BIELY, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3(11): 286-290.
- CARNEIRO, M. D. G.; O. RANDIG; L. G. FREITAS & D. W. DICKSON. 1999. Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. *Nematology*, 1:267-271.
- CHEN, S.; J. CHARNECKI; J. F. PRESTON & D. W. DICKSON. 2000. Extraction and purification of *Pasteuria* spp. endospores. *Journal of Nematology* 32 (1): 78-84.
- DICKSON, D.W.; J. N. SASSER & D. HUISINGH. 1970. Comparative disc-electrophoretic protein analyses of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, and *Aphelenchus* spp. *Journal of Nematology* 2(4):286-293.
- DROPKIN, V. H.; W. L. SMITH Jr. & R. F. MYERS. 1960. Recovery of nematodes from infected roots by maceration. *Nematologica* 5:285-288.
- EUCLIDES, R. F. 1983. Sistema para análise estatística e genética. SAEG. Viçosa, UFV, 57p.
- ERIKSSON, K. E. & B. PETERSSON. 1975. Extracellular enzyme system utilized by fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. I. Separation, purification and physicochemical characterization of five endo-1,4-beta-glucanase. *Eur. J. Biochem* 51: 193-206.
- FAWOLE, O.B. & S.A ODUNFA. 1992. Pectolytic moulds in Nigeria. *Letters in Applied Microbiology* 15: 266-268.

- 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.
- GARG, S. K. & S. NEELAKANTAN. 1982. Effect of nutritional factors on cellulose enzyme and microbial protein production by *Apergillus terreus* and its evolution. *Biotechnology Bioeng.* 21: 109-125.
- HALTRICHI, D.; M. PREISS & W. STEINER. 1993. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microbiology*, v. 15, p. 854-860.
- HUSSEY, R. S. 1971. A technique for obtaining quantities of living *Meloidogyne* females. *Journal of Nematology*, 3(1):99-100.
- ISHII, S. 1981. Isolation and characterization of cell-wall pectic substances from potato tuber. *Phytochemistry* 20: 2329-2333.
- MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Vol. 31 p. 426-428.
- OZCAN, S.; P. KOTTER & M. CIRIACY. 1991. Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast. *Pchia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 190-195.
- PHAM, P.L.; P. TAILLANDIER; M. DELMAS & P. STRTEHAIANO. 1998. Optimization of a culture medium for xylanase production by *Bacillus* sp. using statistical experimental designs. *Word journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 185-190.
- SASSER, J.N.; & M.F. KIRBY. 1979. Crop cultivars resistant to root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., with information on seed sources. *Coop. Publ. Dep. Plant Pathol., North Carolina State University., U.S.A Agency Int. Dev., Raleigh, N.C.* p.24
- SELBY, K. 1968. *Mechanism of biodegradation of cellulose.* Ed. London. Elsevier/North Holland.
- SHAWALE, J.G. & J.G. SADANA. 1978. Cellulase and beta-glucosidase production by a basidiomycetes species. *Canadian Journal of Microbiology* 24(10): 1204-1216.
- SOARES-RAMOS, J.R.L. 1996. Atividade poligalacturonase produzida por *Penicillium griseoroseum* (Tese). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 39 p.
- SOUZA, J.T. de & V.P. CAMPOS. 1998. Quantificação de endósporos de *Pasteuria penetrans* em solo e raízes. *Nematologia Brasileira*, 22 (1): 22-31.
- TSAO, G.T. 1986. Structures of Cellulosic Materials and their Hydrolysis by Enzymes. In: D.I. ALANI; M. MOON-YOUNG, (Ed.). *Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology.* Elsevier Applied Science Publishers, London, p. 205-212.

WOOD, T. M. & S. I. McCRAE. 1986. Purification and properties of a cellobiohydrolase from *Penicillium pinophilum*. Carbohydrate Research, 148: 331-344.

ARTIGO II

Efeito da Extração Enzimática de Fêmeas de *Meloidogyne* spp. na Identificação de Espécies por Eletroforese de Isoenzimas

RESUMO

Avaliou-se o efeito da extração de fêmeas de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* por maceração de raízes de tomateiro, com preparações enzimáticas produzidas pelo fungo *Penicillium griseoroseum*. Os extratos protéicos das fêmeas extraídas foram utilizados para a identificação dos nematóides por eletroforese de isoenzimas. Raízes com galhas foram imersas em solução tamponada de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e enzimas liofilizadas nos seguintes valores de atividade enzimática em U/mL (U= unidades): 0 (testemunha), 50, 100, 150 e 200, em tubos de centrifuga. Após incubação por 24 h a 40°C, as raízes maceradas foram colocadas sobre peneiras e friccionadas levemente para a extração das fêmeas, que foram subsequentemente submetidas ao processo de identificação de espécie por eletroforese de isoenzimas. A concentração enzimática que apresentou melhor resultado na liberação de fêmeas foi a de 200 U/mL. Possivelmente a temperatura de 40°C, em que as raízes foram incubadas com as enzimas, afetou a revelação dos fenótipos (bandas) de esterase das espécies de *Meloidogyne*, uma vez que quando a temperatura de incubação foi de 35°C, não afetou totalmente a revelação dos fenótipos de esterase tanto quanto 40°C, mas não permitiu a identificação das espécies com certa nitidez. Não se observou efeito direto das enzimas no processo de identificação por eletroforese de isoenzimas.

Palavras-chave: Degradação enzimática, pectinase, xilanase, celulase, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, liofilização, eletroforese.

Introdução

O gênero *Meloidogyne* é considerado o mais importante dentre os nematóides fitoparasitas, pois possui ampla distribuição geográfica e causa severos danos em espécies de fruteiras, hortaliças, plantas ornamentais, soja, café, feijão, plantas

florestais, etc. Este gênero inclui mais de 80 espécies, sendo as principais: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* (Sasser, 1980; Hartman & Sasser, 1985).

A identificação das espécies de *Meloidogyne* pode ser feita através da observação da configuração perineal ao microscópio ótico. Entretanto, este é um método subjetivo e requer muita experiência de quem a realiza. É possível a ocorrência de populações com configurações atípicas e além disso, existe um grande número de espécies com configurações semelhantes, dificultando a utilização desse método (Eisenback, 1985).

Atualmente, a eletroforese é aplicada em análise de enzimas e proteínas de microrganismos, estudos de taxonomia, fisiologia de plantas e em bioquímica. Esse método apresenta grande potencial para a caracterização e a identificação de fungos, bactérias, vírus, cultivares de plantas resistentes, interação de patógeno-hospedeiro, nematóides, etc. (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Alfenas *et al.*, 1991).

A técnica de eletroforese para identificação de nematóide, é baseada em características bioquímicas como perfis protéicos e enzimáticos e teve seus estudos iniciados há mais de 30 anos por Dickson *et al.* (1971) com extratos obtidos da maceração de vários indivíduos. Mais tarde, esse método foi aperfeiçoado por Bergé & Dalmaso (1975) e Dalmaso & Bergé (1978), que utilizaram um gel ultrafino e apenas extrato de uma fêmea por cavidade.

A eletroforese de isoenzimas tem se destacado para a caracterização e a identificação de fitonematóides por apresentar as seguintes vantagens: alta eficiência na diferenciação das principais espécies do gênero *Meloidogyne*, identificação de populações atípicas, versatilidade, simplicidade, rapidez, custo relativamente baixo e grande poder informativo (Hussey *et al.*, 1972; Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Carneiro *et al.*, 1996; 2000). Os fenótipos oriundos das bandas de esterase são os mais utilizados na identificação das espécies do gênero, seguidos das enzimas malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase.

A primeira etapa da técnica de eletroforese é a extração e a seleção de fêmeas de *Meloidogyne* das galhas de raízes (Carneiro *et al.*, 2001). Tal operação de extração é feita à mão e com auxílio de microscópio estereoscópio, estilete e pinça, resultando, freqüentemente, na ruptura da cutícula da fêmea do nematóide e extrusão do fluido pseudocelômico. No intuito de facilitar tal operação, enzimas podem ser usadas para amolecer e dissolver o tecido das galhas de raízes, liberando fêmeas intactas, que podem ser coletadas em peneiras sob jato d'água de torneira e identificadas por

eletroforese. Entretanto, não se sabe ainda se o processo enzimático de degradação das raízes interfere no metabolismo ou mesmo nos constituintes bioquímicos de fêmeas de *Meloidogyne* spp., prejudicando a identificação por meio de eletroforese de isoenzimas.

As substâncias pécnicas são as principais constituintes da lamela média situada entre as paredes primárias celulares das plantas superiores, atuando como adesivo intercelular e conferindo aderência às paredes primárias de duas células adjacentes. As pectinases, ou enzimas pectinolíticas, são enzimas que degradam as substâncias pécnicas (Ishii, 1981). A pectina é um polissacarídeo estrutural para as células vegetais e sua degradação acarreta na desintegração dos tecidos por separação celular, resultando num processo denominado maceração (Bailey & Pessa, 1990). A xilana é o componente mais comum da parede celular secundária (Bailey & Pessa, 1990). Acredita-se que o efeito da pectinase aliado ao efeito da xilanase venham intensificar a maceração celular.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência das enzimas pectinase, xilanase e celulase, produzidas pelo fungo *Penicillium griseoroseum*, na identificação de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. Arenaria*, pela técnica de eletroforese de isoenzimas.

Material e Métodos

1- Produção de enzimas pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas

O fungo *P. griseoroseum* utilizado no experimento, foi isolado em laboratório a partir de sementes de plantas florestais e cultivados em meio ágar-aveia (40 g L⁻¹ de farinha de aveia e 15 g L⁻¹ de ágar-ágar) em tubos inclinados a 26 °C, por sete dias, para a produção do inóculo. Suspensões aquosas do fungo foram obtidas através da adição de 10 mL de solução Tween 80 a 4% à superfície do meio e sua raspagem com alça de platina. A suspensão de esporos, na concentração de 2x10⁸ esporos/mL, foi adicionada ao meio mineral [6,02 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 20 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e 10 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O], pH 7,2, e ao extrato de levedura 6% (p/v). O meio mineral, o MgSO₄, o extrato de levedura e o farelo de trigo, foram esterilizados, separadamente, em autoclave a 121°C por 30 min. Para a produção de enzimas, cultivaram-se os fungos em 50 mL de meio mineral e 50 g de farelo de trigo, em Béquer de 500 mL em incubadora a 26°C por oito dias, sem agitação. Após esse período, 200 mL de água destilada estéril foram adicionados a cada frasco. A mistura foi agitada em agitador orbital a 150 rpm,

em temperatura ambiente de laboratório por 30 min, separando-se a enzima bruta do meio de cultura através de filtração, utilizando-se saco de náilon de 400 malhas/polegada quadrada.

2- Liofilização de enzimas produzidas por *Penicillium griseoroseum*

As enzimas brutas de *Penicillium griseoroseum*, selecionadas em estudos anteriores por serem mais efetivas na extração de fêmeas de *Meloidogyne* spp. do interior das raízes (Júlio *et al.*, 2003), foram submetidas ao processo de liofilização.

A enzima bruta obtida do fungo *P. griseoroseum* foi centrifugada a 22.000 x g por 20 min a 1°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, colocado em bandejas de aço inox (150 mL/bandeja) e congelado em *freezer* a -70°C. Posteriormente, as bandejas com o material congelado foram colocadas no liofilizador a -60°C com pressão negativa de -8 atm/48 h. A seguir, as enzimas concentradas na forma de pó, foram raspadas das bandejas utilizando-se uma espátula, armazenadas em recipiente de vidro (tubo de penicilina 50 mL) e guardadas em geladeira.

3- Determinação da atividade das enzimas liofilizadas

A atividade enzimática foi determinada de acordo com Haltrich *et al.* (1993), perfazendo três tratamentos com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Para a determinação da atividade enzimática de pectinase, xilanase e celulase, pesou-se 0,1 g da enzima liofilizada e diluiu-se em 10 mL de H₂O destilada. Para determinar a atividade enzimática da pectinase, utilizou-se ácido poligalacturônico 1,2% (p/v) como substrato, diluído em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8, contendo NaCl 100 mM. A mistura de reação, constituída de 100 µL de substrato, 10 µL da enzima diluída e 890 µL de H₂O destilada, foi incubada por 30 min, a 40°C. Após, adicionou-se a cada tubo de ensaio 1 mL de DNS (ácido dinitrossalicílico) (Miller, 1959). As amostras, foram colocadas em banho fervente e resfriadas. As leituras de absorvância foram feitas a 540 nm, faixa da luz visível. Utilizou-se glicose para a confecção da curva-padrão.

A dosagem da atividade de xilanase foi realizada como a da pectinase, substituindo-se o substrato por xilana *oat spelt* (Sigma) 1% (p/v), diluída em tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 a 60°C. A mistura de reação constituiu-se de 500 µL de substrato, 10 µL da enzima diluída e 490 µL de H₂O. Após a reação, foi acrescido a

cada tubo de ensaio 1 mL de DNS para a quantificação dos açúcares redutores. Utilizou-se xilose para a confecção da curva-padrão.

A atividade da celulase foi determinada pela formação de açúcar redutor, empregando o método de Haltrich *et al.* (1993) que utiliza glicose como padrão. O substrato utilizado foi papel Whatman Nº 1 recortado em círculos de 5 mm de diâmetro. A reação procedeu-se da seguinte maneira: nos tratamentos testemunhas, quatro círculos de papel e 1.200 µL de enzima em tampão (acetato de sódio 100 mM, pH 5,0) foram colocados em um tubo de ensaio, retirando-se, imediatamente, uma alíquota de 600 µL para dosagem com 1 mL de DNS e 400 µL de H₂O destilada. Já nos tubos de reação (três repetições), os círculos de papel juntamente com a enzima foram incubados por 18 h a 40°C. Após, uma alíquota de 600 µL foi retirada e acrescida em 1mL de DNS e 400 µL de H₂O destilada, para posterior dosagem. O tubo branco (testemunha) e os tubos de reações foram fervidos por 5 min para que a reação ocorresse. A seguir, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 540 nm, faixa da luz visível, para a determinação da atividade enzimática.

4- Extração de fêmeas de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* das raízes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' por maceração com enzimas liofilizadas

Foram pesados 2 g de raízes finas com galhas parasitadas por *M. incognita*, *M. javanica* ou *M. Arenaria*, e imersas em 10 mL de solução tamponada (acetato de sódio 100 mM, pH 5,0) e enzimas liofilizadas nos seguintes valores de atividade enzimática da pectinase em U/mL (U= unidades; 1 U é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 mmol de produto por minuto sob condições definidas): 0 (testemunha), 50, 100, 150 e 200, em tubos de centrifuga de 50 mL de capacidade com 5 repetições/tratamento. Os tubos foram fechados e incubados no escuro por 24 h a 40°C. Após esse período, as raízes maceradas foram colocadas sobre peneira de 0,850 mm de abertura de malha (20 'mesh') sobre outra de 0,150 mm (100 'mesh'), e levemente friccionadas com os dedos para extração das fêmeas, as quais foram contadas com auxílio de um microscópio estereoscópico. A análise estatística consistiu de cinco tratamentos e cinco repetições.

5- Avaliação da esterase de *Meloidogyne* spp. obtidas por maceração enzimática por meio de PAGE

Fêmeas branco-leitosas, extraídas pelo processo de maceração com solução enzimática contendo 200 U/mL das enzimas liofilizadas, foram colocadas em tubos tipo Eppendorf contendo solução tampão (Sample Bufferi), uma ou quatro fêmeas de cada espécie por tubo. A testemunha foi representada por fêmeas branco-leitosas extraídas manualmente com ajuda de estilete e pinça sob microscópio estereoscópico, e colocadas em tubos tipo Eppendorf, contendo 100 µL de solução tampão (Sample Bufferi) e armazenadas em *freezer* a -4°C, para posterior utilização. Cada tratamento constituiu-se de seis repetições. As fêmeas, imersas em solução tampão, foram trituradas em banho de gelo. O extrato protéico obtido foi pipetado e aplicado nas cavidades do gel empilhador. A espécie *M. javanica* foi utilizada como padrão, dispondo-se do extrato de quatro fêmeas por cavidade, nas cavidades laterais e na cavidade central do gel. O preparo dos géis e as corridas eletroforéticas foram feitos em sistema descontínuo (Orntein & Davis, 1964). Foram avaliadas uma ou quatro fêmeas de *M. javanica* por cavidade, numa corrida em um único gel.

Testou-se, também, o efeito da temperatura de incubação de 35°C, no processo de maceração enzimática com o objetivo de avaliar se a temperatura, e não as enzimas de *P. griseoroseum*, afetava a revelação de bandas no gel.

A eletroforese foi conduzida em refrigerador à 8°C, sob voltagem de 80 V/15 min e 200 V/30 min. A migração das enzimas foi monitorada por meio do deslocamento da linha frontal do azul de bromofenol.

Após as corridas eletroforéticas, os géis foram retirados das placas e submetidos à revelação das isoenzimas esterase (EST), conforme proposto por Alfenas *et al.* (1991). Após a coloração, os géis foram lavados em água destilada e colocados em uma mistura de água, álcool metílico e ácido acético (na proporção 5:5:1) por 15 min para fixação. Em seguida, foram lavados com água destilada e submetidos à secagem por 24 h em temperatura ambiente (aproximadamente 24°C), em bastidores. Seguiu-se a mesma metodologia anterior, exceto que foram usados extratos de quatro fêmeas de *M. javanica*, *M. incognita* ou de *M. arenaria* por cavidade, num único gel. Após a secagem, os resultados foram observados, considerando possíveis alterações no padrão das bandas.

Resultados e Discussão

1- Determinação da atividade enzimática de pectinase, xilanase e celulase

Após o processo de liofilização das enzimas de *P. griseoroseum*, a pectinase apresentou maior atividade enzimática seguida da xilanase e da celulase (Tabela 1). A atividade enzimática da pectinase após a concentração, aumentou em 86 vezes em relação à enzima bruta, em 4,85 vezes para xilanase e em 8,42 vezes para celulase. O fato de a preparação enzimática liofilizada apresentar maior atividade para pectinase e em menor extensão para a xilanase, pode explicar a maior liberação de fêmeas das raízes, pois a pectina é o principal constituinte da lamela média que une uma célula à outra (Ishii, 1981) e a xilana é abundante na parede celular secundária (Bailey & Pessa, 1990).

A enzima celulase teve atividade baixa, pois na maioria dos microrganismos, são enzimas induzidas. Entretanto, dependendo da constituição do meio de cultura utilizado para crescimento, outras enzimas, como as proteases, poderão ser induzidas. Estas, quando presentes no meio, podem degradar as celulases a uma heterogeneidade de enzimas, produzindo uma diversidade de isoenzimas. Por outro lado, a eficiência da atividade celulolítica pode estar ligada às proteases do meio (Mandels, 1982). A baixa atividade enzimática da celulase subentende que o seu efeito foi menos significativo na maceração celular. Além disso, o fungo *P. griseoroseum* apresenta pequena quantidade de celulase constitutiva, em relação a outros microrganismos produtores de pectinases (Soares-Ramos, 1996).

A atividade de pectinases totais, xilanases e celulases produzida por *Penicillium griseoroseum* crescidos por oito dias em meio mínimo em farelo de trigo, submetidas ao processo de liofilização e reconstituídas usando 10 g/L, foi de 105,7 U/mL para pectinase, 11,75 U/mL para xilanase e 0,42 U/mL para celulase.

2- Extração de fêmeas de *Meloidogyne* spp. por maceração enzimática

As análises de regressão entre o número de fêmeas de *Meloidogyne* spp. liberadas e as concentrações enzimáticas, revelaram coeficientes de crescimento linear demonstrando relação positiva entre a liberação de fêmeas e a concentração enzimática em U/mL. De acordo com as Figuras 1, 2 e 3, acredita-se que quanto mais concentrada a preparação enzimática, mais fêmeas são extraídas das raízes.

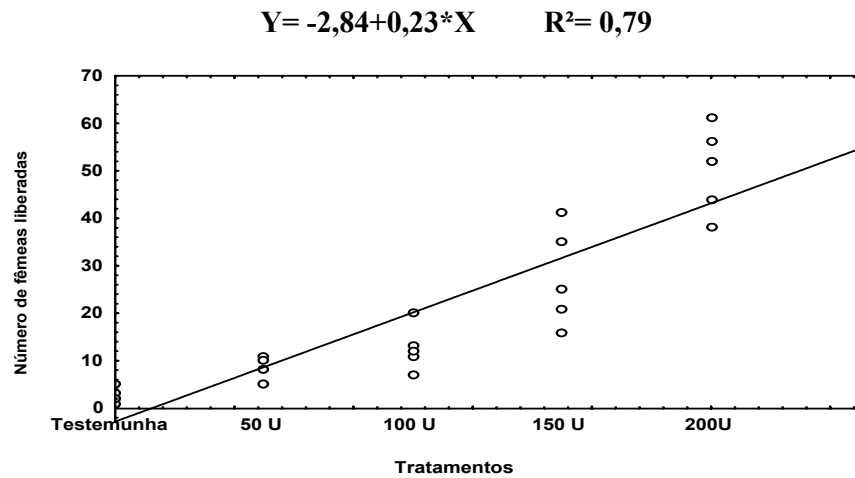


Figura 1 - Número de fêmeas de *Meloidogyne incognita* extraídas pela maceração enzimática de raízes de tomateiro, submetidas às diferentes concentrações de enzima pectinase de *Penicillium griseoroseum*

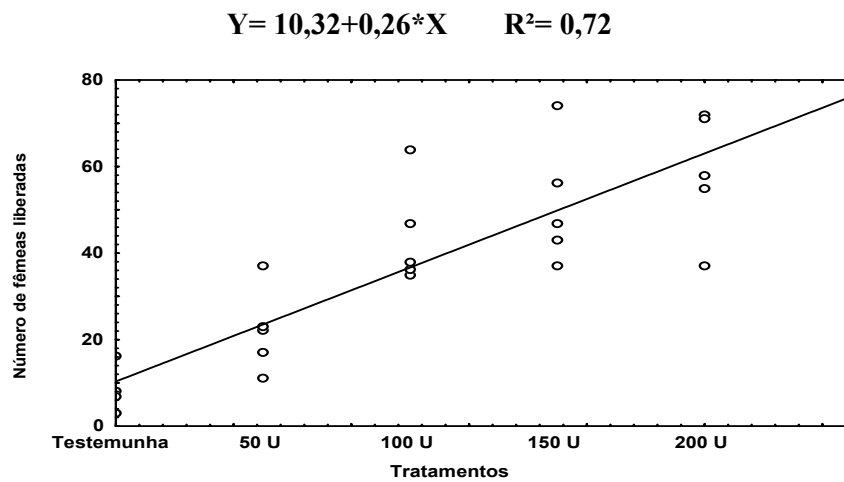


Figura 2 - Número de fêmeas de *Meloidogyne javanica* extraídas pela maceração enzimática de raízes de tomateiro, submetidas às diferentes concentrações de enzima pectinase de *Penicillium griseoroseum*.

$$Y = -1,2 + 0,19 * X \quad R^2 = 0,74$$

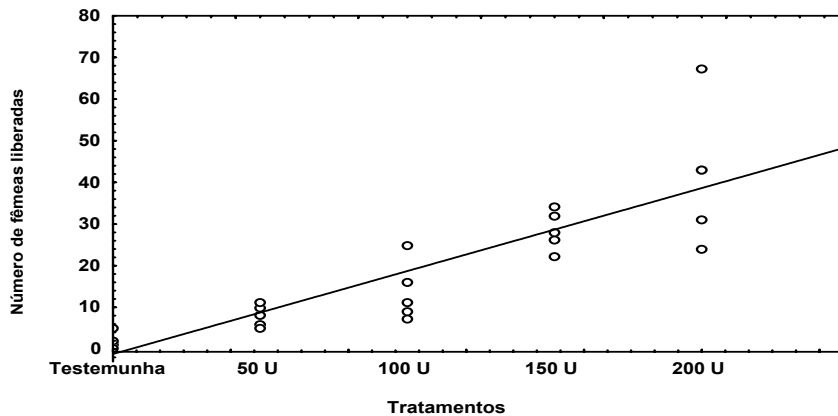


Figura 3 - Número de fêmeas de *Meloidogyne arenaria* extraídas pela maceração enzimática de raízes de tomateiro, submetidas às diferentes concentrações de enzima pectinase de *Penicillium griseoroseum*.

3- Avaliação da esterase de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*

As fêmeas de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, extraídas das raízes de tomateiro por maceração enzimática na concentração de 200 U/mL, foram submetidas a corridas eletroforéticas, mas não puderam ser identificadas pois não houve formação de bandas no gel, ao passo que as bandas se revelaram como esperado quando as fêmeas foram extraídas manualmente das raízes (Figuras 4, 5 e 6). É possível que a alta temperatura de incubação das raízes (40°C), ótima para pectinases (poligalacturonase) (Soares-Ramos, 1996) e xilanase (Querido, 2002), tenha desnaturado as isoenzimas esterase no interior do corpo das fêmeas, dentro das raízes. De acordo com Alfenas e Brune (1998), a extração de fêmeas pode ser feita à temperatura ambiente de 22°C a 27°C, sem afetar a integridade das fêmeas e a atividade enzimática, mas, sob temperaturas mais elevadas, recomenda-se manter as amostras sob barra de gelo. A maioria das enzimas é completamente estável de 20 a 35°C, mas acima de 35°C há perda de atividade e a taxa de perda da atividade é maior a altas temperaturas (Whitaker, 1994).

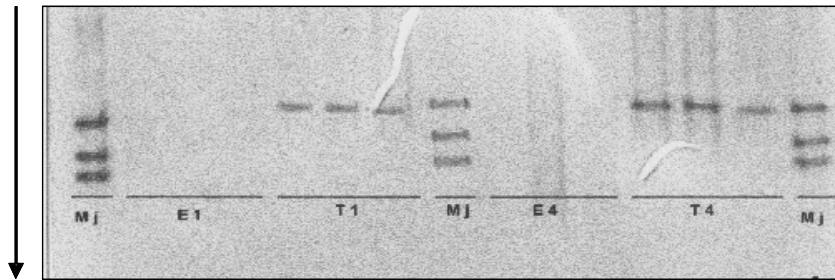


Figura 4 - Fenótipos de esterase de *Meloidogyne incognita*, obtidos de fêmeas extraídas manualmente e por maceração enzimática a 40°C. **E1** e **E4** = fêmeas extraídas de raízes por maceração enzimática, extrato de uma e quatro fêmeas por cavidade do gel; **T1** e **T4** = fêmeas extraídas manualmente, extrato de uma e quatro fêmeas por cavidade. **Mj** = fêmeas de *M. javanica* (padrão).

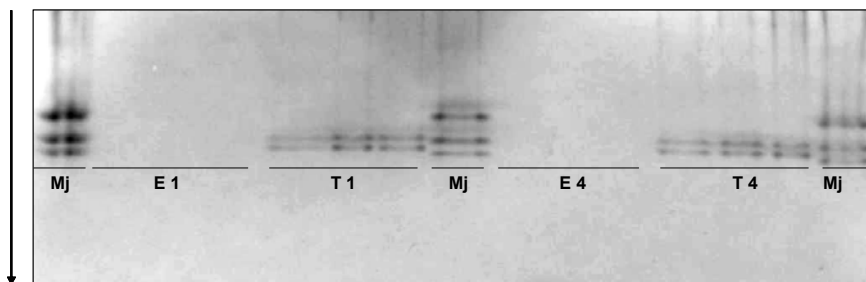


Figura 5 - Fenótipos de esterase de *Meloidogyne arenaria*, obtidos de fêmeas de extraídas manualmente e por maceração enzimática a 40°C. **E1** e **E4** = fêmeas extraídas de raízes por maceração enzimática, extrato de uma e quatro fêmeas por cavidade do gel; **T1** e **T4** = fêmeas extraídas manualmente, extrato de uma e quatro fêmeas por cavidade. **Mj** = fêmeas de *M. javanica* (padrão).

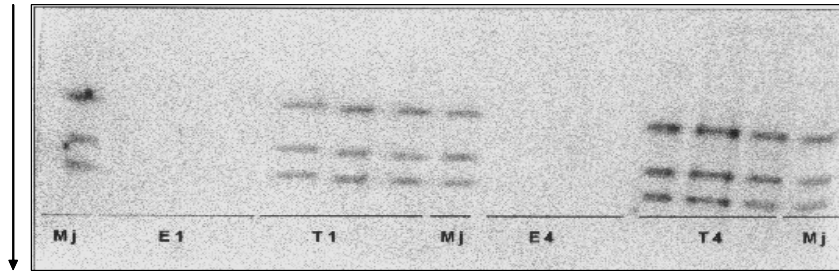


Figura 6 - Fenótipos de esterase de *Meloidogyne javanica*, obtidos de fêmeas de extraídas manualmente e por maceração enzimática a 40°C. **E1** e **E4** = fêmeas extraídas de raízes por maceração enzimática, extrato de uma e quatro fêmeas por cavidade do gel; **T1** e **T4** = fêmeas extraídas manualmente, extrato de uma e quatro fêmeas por cavidade. **Mj** = fêmeas de *M. javanica* (padrão).

Os fenótipos de esterase das espécies de *Meloidogyne* extraídas por maceração enzimática à temperatura de 35°C (Figura 7), foram afetados e as bandas revelaram-se muito fracamente, indicando o efeito da temperatura na desnaturação das enzimas das fêmeas. De acordo com Soares-Ramos (1996), a atividade ótima de atuação de poligalacturonase, enzima que faz parte do complexo das pectinases é de 40°C, caindo gradativamente para temperaturas inferiores ou superiores a este valor. Temperaturas menores promovem redução na velocidade de reação. Por outro lado, temperaturas altas promovem a desnaturação de enzimas e, conseqüentemente, a redução de atividade enzimática. Quando o fungo cresce sob forma de células livres, a temperatura ótima de atuação da enzima é de 35°C. De acordo com Querido (2002), a temperatura ótima da atividade da xilanase de *Penicillium expansum* é de 40°C. As xilanases de origem fúngica, normalmente, mostram atividade ótima em torno de 30°C, sendo inativadas em temperaturas superiores a 65°C, portanto a extração enzimática de fêmeas pode ser realizada em temperatura de incubação de 35°C; ou até mesmo 30°C, aparentemente sem redução do número de fêmeas extraídas. Entretanto, tal comparação não foi objetivo desse trabalho e merece investigações futuras. As bandas reveladas de fêmeas extraídas manualmente apresentam-se muito mais nítidas que as extraídas de fêmeas incubadas a 35°C durante a extração enzimática, portanto a incubação pode resultar em dúvidas durante o processo de identificação de espécies. Desse modo, a técnica de extração enzimática de fêmeas *Meloidogyne* spp. para a identificação por eletroforese

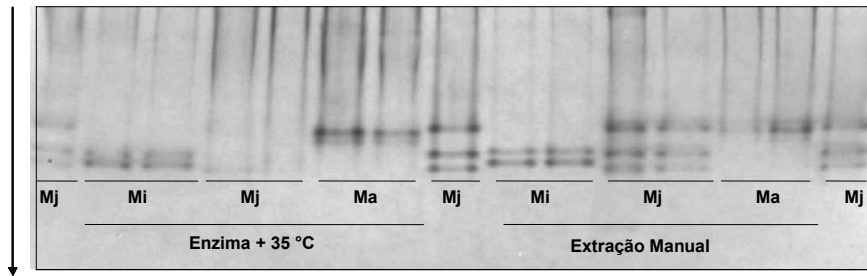


Figura 7 - Fenótipo de esterase de populações de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, extraídas de raízes de tomateiro por maceração enzimática a 35°C. Mi = *M. incognita*, Mj = *M. javanica* e Ma = *M. arenaria*.

de isoenzimas não se mostrou eficiente. Essa técnica pode ser valiosa quando se requer número maior de fêmeas e cuja extração manual é muito laboriosa devido ao seu pequeno tamanho ou à natureza lenhosa das raízes, como *M. exigua* em café. Porém, é sensato que se teste essa técnica para esse nematóide e a temperatura mais baixa de incubação antes que se possa recomendá-la.

Literatura Citada

- ALFENAS, A.C. & W.BRUNE. 1998. Eletroforese em gel de poliácridamida. UFV ed. Viçosa-MG.
- ALFENAS, A.C.; L.PETERS; W. BRUNE & G.C. PASSADOR. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 242p.
- ALFENAS, A.C.; I. PETERS; W. BRUNE & G.C. PASSADOR. 1999. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: SIF, 242p.
- BAILEY, M.J. & E. PESSA. 1990. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbiology Technology*. 12: 266-271.
- BERGÉ, J.B. & A. DALMASSO. 1975. Caracteristiques biochimiques de quelques populations de *Meloidogyne* spp. *Cah. ORSTOM, Sér. Biol.*, 10: 263-271.
- CARNEIRO, M.D.G., R. G. CARNEIRO; I.M.O. ABRANTES; M.S.N.A. SANTOS & M.R.A. ALMEIDA.1996. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: *Meloidogyne*), a root-knot nematode parasitizing coffee em Brasil. *Journal Nematology* 28: 177-189.

- CARNEIRO, M.D.G.; M.R.A. ALMEIDA & P. QUÉNHERVÉ. 2000. Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2: 645-654.
- CARNEIRO, M.D.G. & M.R.A. ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25: 35-44.
- DALMASSO, A. & J.B. BERGÉ. 1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: application to the taxonomy of *Meloidogyne*. *Journal of Nematology* 10: 323-332.
- DICKSON, D.W.; D. HUISINGH & J.N. SASSER. 1971. Dehydrogenase, acid alkaline phosphatases and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. *Journal of Nematology* 1: 1-16.
- EISENBACK, J.D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) In: Sasser, J.N. & C.C. Carter (Ed.) *An advanced treatise on Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University v.1, pp. 95-112.
- ESBENSHADE, P.R. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22: 10-15.
- FERREIRA, M.E. & D. GRATTAPAGLIA, 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 220p.
- HALTRICH, D.; M. PREISS & W. STEINER. 1993. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microbiology*, v. 15, p. 854-860.
- HARTMAN, K.M. & J.N. SASSER. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: K.R. Barker, J.N. Sasser (Ed.) *An advanced treatise on Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.2, p.69-77.
- HUSSEY, R.S.; J.N. SASSER & D. HUISINGH. 1972. Disc-electrophoretics studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Journal of Nematology* 4: 183-189.
- ISHII, S. 1981. Isolation and characterization of cell-wall pectic substances from potato tuber. *Phytochemistry* 20: 2329-2333.
- JÚLIO, V.A.; L.G. FREITAS; J.L. CALVACANTE COELHO; D.C. MUSCARDI & S. FERRAZ. 2003. Extração de fêmeas de *Meloidogyne javanica* de raízes de tomateiro pela maceração com enzimas fúngicas. *Nematologia Brasileira*, 27(1): 75-80.
- MANDELS, M. 1982. Cellulases. *Ann. Reports Ferment Process*, 5: 35-78.

- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.*, Vol. 31 p. 426-428.
- ORNSTEIN, L.; B.J. DAVIS. 1964. *Anal. NY Academic Science*, 121-132
- QUERIDO, A.L.S. 2002. Purificação parcial e caracterização da xilanase produzida por *Penicillium expansum*. Dissertação (Mestrado). Viçosa Universidade Federal de Viçosa.
- SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes; a global menace to crop production. *Plant Disease* 64: 36- 41.
- SOARES-RAMOS, J.R.L. 1996. Atividade de poligalacturonase produzida por *Penicillium griseoroseum*. Dissertação (Mestrado). Viçosa Universidade Federal de Viçosa.
- WHITAKER, J.R. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. *Food Science and Technology*, v.61, p. 414-416.

ARTIGO III

Efeitos de Enzimas Fúngicas na Quantificação, Adesão e Reprodução de Endósporos de *Pasteuria penetrans*

RESUMO

Avaliou-se o efeito do método de extração de fêmeas de *Meloidogyne javanica* por maceração de raízes com enzimas produzidas por *Penicillium griseoroseum*, sobre a adesão e reprodução de endósporos de *P. penetrans* e comparou-se o método de determinação da concentração de endósporos em raízes de tomate secas e moídas incubando 2 g do pó em água com enzima de *P. griseoroseum* a 2% e 20%, ambos por 1, 3 ou 24 h a 40°C, antes da maceração com pistilo e almofariz, diluição e contagem. Para avaliar a adesão, fêmeas de *M. javanica*, foram retiradas manualmente com auxílio de um microscópio estereoscópico, estilete e pinça (testemunha) e pela maceração enzimática. Os endósporos obtidos das fêmeas foram submetidos ao teste de adesão em juvenis de *M. javanica*. Após a adesão, os juvenis foram inoculados em planta de tomate para avaliar o efeito das enzimas na reprodução dos endósporos. A enzima na concentração de 20%, independente do tempo de incubação, apresentou maior eficiência na detecção dos endósporos no pó de raiz. Em relação à adesão, endósporos obtidos de fêmeas extraídas por digestão enzimática, aderiram-se em maior número aos J2 de *M. javanica* que endósporos de fêmeas retiradas manualmente. A reprodução de *P. penetrans* em fêmeas de *M. javanica* não foi afetada pela enzima ($P>0,05$).

Palavras-chave: Maceração enzimática, quantificação de endósporos, adesão, *Pasteuria penetrans*, *Penicillium griseoroseum*, *Meloidogyne javanica*.

Introdução

Há um grande número de microrganismos usados no controle biológico de fitonematóides e dentre esses, destacam-se as bactérias do gênero *Pasteuria* spp. Metchnikoff, 1888. Essas bactérias são gram positivas, formadoras de pseudo-micélio e endósporos no interior de seus hospedeiros, e chamam a atenção pelo seu potencial no controle biológico de nematóides (Freitas & Carneiro, 2000). Muitos estudos sobre a

adesão de endósporos a nematóides foram realizados, mas segundo Ratnasoma & Gowen (1996), há pouco conhecimento sobre os fatores que envolvem a adesão. De acordo com Davies *et al.* (1992), a adesão dos endósporos à cutícula de fitonematóides varia em função do tipo e quantidade de proteínas presentes na superfície dos endósporos.

Segundo Davies & Danks (1993), é provável que carboidratos presentes na superfície da cutícula dos nematóides reajam com moléculas de N-acetylglucosamina presentes na superfície dos endósporos de *P. penetrans*, que são ligadas a outras proteínas ou peptidoglicanos que são extensão da parede celular da bactéria. Esta interação química entre o endósporo e a cutícula do nematóide pode ser prejudicada pela temperatura (Stirling *et al.*, 1990), pois quando os endósporos são expostos ao calor, pode ocorrer a solubilização ou desnaturação de moléculas envolvidas na adesão citado por (Freitas *et al.*, 1997).

Fatores abióticos também podem afetar a afinidade entre *P. penetrans* e seu nematóide hospedeiro, como temperatura e pH (Freitas & Carneiro, 2000). Stirling (1991) observou que endósporos submetidos a temperaturas de 25 a 30°C, se aderiram em maior número ao nematóide. Ratnasoma & Gowen (1996) observaram maior adesão em pH 5,0 e 8,5 e redução da adesão em pH 3 e 10. Além desses fatores, enzimas têm influenciado no processo de adesão da bactéria. Davies & Danks (1993) observaram que a pré-incubação de J2 em diferentes enzimas glicolíticas, resultou em menor adesão de endósporos de *P. penetrans* à cutícula, quando comparados com aqueles incubados na solução tampão. Os autores também observaram em tratamento similar com pepsina, proteinase K, quimiotripsina e lipase, redução significativa na adesão dos endósporos entre 31 e 81%. Maximiliano *et al.* (2001), ao estudarem o efeito da pectinase e celulase comercial na adesão de endósporos de *P. penetrans*, constataram que a pectinase-SIGMA P-9179 de *Aspergillus niger*, reduziu a adesão de endósporos de *P. penetrans* em juvenis do segundo estágio de *M. javanica*, o que não aconteceu com a celulase-SIGMA C-1184, permitindo supor que algum substrato promotor da ligação do endósporo a esse hospedeiro foi degradado pela pectinase, mas não pela celulase. Também estudaram o efeito do pré-tratamento dos endósporos e da concentração de pectinase-SIGMA 0,1% ou 1%, e observaram que endósporos de *P. penetrans*, incubados com *M. javanica*, tiveram redução na adesão.

Como *P. penetrans* ainda não foi cultivada satisfatoriamente 'in vitro' (Dickson *et al.* 1994; Campos *et al.*, 1998), sua produção massal só é possível através

da adesão de endósporos em juvenis de segundo estágio (J2) e inoculação destes em raízes de plantas hospedeiras. Após 60 dias da inoculação, o sistema radicular é seco e moído, formando um pó de raiz contendo endósporos, utilizado como fonte de inóculo em experimentos ou propriamente no controle de fitonematóides (Stirling & Wachtel, 1980). Outro método de obtenção de endósporos é a extração de fêmeas parasitadas pela bactéria em raízes de plantas hospedeiras, principalmente o tomateiro, as quais são transferidas para suspensão aquosa, em um tubo de ensaio, onde são maceradas com um pilão para a extrusão dos endósporos. A extração de fêmeas de raízes, nesse caso, é feita manualmente, com o auxílio de microscópio estereoscópico, estiletes e pinça e apresenta grande risco de perfuração da cutícula da fêmea, acarretando o extravasamento do fluido pseudocelômico e perda de endósporos da bactéria. Essa extração pode ser otimizada em tempo e eficácia pela maceração das raízes com enzimas pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas para a liberação das fêmeas, que são posteriormente coletadas e enxaguadas sobre peneiras. Entretanto, não se sabe se a atividade dessas enzimas nas fêmeas pode afetar a reprodução e adesão dos endósporos à cutícula do nematóide hospedeiro. Portanto, avaliar tal possibilidade foi um dos objetivos desse trabalho.

Material e Métodos

1- Obtenção dos endósporos de *P. penetrans*

O inóculo de *P. penetrans* foi obtido de uma população mista de isolados provenientes de várias regiões de MG e MA. Os endósporos da bactéria foram obtidos de fêmeas de *M. javanica* parasitando plantas de tomate Santa Cruz 'Kada' em casa de vegetação. As fêmeas foram retiradas manualmente com auxílio de um microscópio estereoscópico, estilete e pinça (testemunha) e por maceração enzimática com enzimas produzidas por *P. griseoroseum*, na concentração de 200 U/mL. Após a extração, as fêmeas de cada tratamento foram transferidas para tubos tipo Eppendorf contendo água destilada estéril e trituradas com um bastão de vidro de ponta fina para obtenção da suspensão dos endósporos. Estes foram submetidos ao tratamento de ultrassom por duas vezes por 30 min para o rompimento do esporângio, a fim de permitir a adesão destes aos juvenis de segundo estágio de *M. javanica*. Os endósporos obtidos foram quantificados em câmara de Neubauer, as suspensões ajustadas para

9×10^6 endósporos/mL e armazenadas em geladeira a 8°C até a sua utilização (cerca 5 dias).

2- Influência do método de extração na obtenção de endósporos de *P. penetrans* a partir de raízes de tomateiro

Raízes de tomateiro infectadas com fêmeas de *Meloidogyne* spp. e parasitadas por *P. penetrans*, obtidas de plantas de tomate Santa Cruz 'Kada' cultivadas em caixas plásticas em casa de vegetação, foram secas e moídas em micro moinho (General Electric modelo 5XBGOOG) para serem utilizadas nos ensaios. Dois gramas do pó obtido foram colocados em almofariz e umedecidos com 5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e, ou enzima liofilizada na concentração de 200 U/mL produzida pelo fungo *P. griseoroseum*. Os tratamentos constituíram em incubar, a 40°C, o pó de raiz em tampão (testemunha), em tampão com enzima a 2% e em tampão mais enzima a 20%. Decorridos os tempos de incubação, 1 h, 3 h ou 24 h, o pó umedecido de cada tratamento foi macerado com um pistilo por 5 min até a sua total desintegração. Após a maceração, o material foi transferido para uma proveta, o volume foi completado para 50 mL com água destilada e 100 µL foram transferidos para câmara de Neubauer para a contagem do número de endósporos/mL. Cada tratamento constituiu de três repetições, com duas leituras por repetição.

3- Efeito das enzimas na adesão dos endósporos de *P. penetrans* em juvenis de segundo estágio e na reprodução de *M. javanica*

A população de *M. javanica* foi mantida em plantas de tomateiro Santa Cruz 'Kada', em vasos com capacidade de 4,0 L, em casa de vegetação por 40 dias, quando os ovos foram extraídos das raízes com galhas pelo método de Hussey & Barker (1973), modificado por Bonetti & Ferraz (1981) e colocados em funis de Baermann para a obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2), que foram utilizados em testes de adesão.

Cerca de 2.000 J2 de *M. javanica* em 10 mL de água, foram adicionadas por placa de Petri de 5,5 cm de diâmetro. Um mililitro de suspensão com 9×10^6 endósporos de *P. penetrans*, obtidos de fêmeas extraídas manualmente (testemunha) ou 1 mL de suspensão 9×10^6 endósporos de *P. penetrans*, obtidos de fêmeas extraídas por enzimas na concentração de 200 U/mL, foram adicionados por placa de Petri, a qual permaneceu por 24 h em temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) para a adesão. A seguir, foi

avaliada a adesão dos endósporos em 20 J2 de *M. javanica* escolhidos ao acaso, em quatro repetições de cada tratamento.

4- Efeito de enzimas na reprodução de endósporos de *P. penetrans* em fêmeas de *M. javanica*

Após a avaliação da adesão dos endósporos aos juvenis de *M. javanica*, cerca de 2.000 J2 com endósporos provenientes de cada tratamento, foram inoculados em plântulas de tomate com 15 cm de altura em vasos com 4,0 L de capacidade contendo uma mistura de solo e areia na proporção 1:1 (v:v), previamente desinfestada com brometo de metila. Após 60 dias da inoculação, avaliaram-se o número de galhas por raiz e o número de ovos, os quais foram extraídos das raízes pelo método de Hussey & Barker (1973) e quantificados em câmara de Newbauer, através de microscópio estereoscópico. A seguir, 20 fêmeas de *M. javanica* de cada repetição foram extraídas manualmente, transferidas para tubos tipo Eppendorf, maceradas com bastão de vidro de ponta fina e os endósporos quantificados em câmara de Newbauer. Cada tratamento constituiu de dez repetições em delineamento inteiramente casualizado. As análises estatísticas dos dados referentes às avaliações de galhas, ovos e número de endósporos em 20 fêmeas, foram realizados pelo teste F utilizando-se o programa SAEG (Euclides, 1983).

Resultados e Discussão

1- Influência do método de extração na obtenção de endósporos de *P. penetrans* a partir de raízes de tomateiro

A análise de variância da concentração enzimática e tempo de incubação não revelou interação entre os fatores ($P > 0,05$). Os dados foram analisados de forma independente para os fatores concentração enzimática e tempo de incubação. Entretanto, nenhum modelo testado foi ajustado em função do baixo coeficiente de determinação apresentado ($R^2 = 0,41$). Desta forma, procedeu-se à análise das médias com seus respectivos intervalos de confiança (Teste T a 5% de probabilidade) e verificou-se que as enzimas de *P. griseoroseum*, a 20%, foram mais eficientes na liberação de endósporos de *P. penetrans*. Essa concentração permitiu detectar 48,6% e 134% mais endósporos de *P. penetrans*/g de pó de raiz que a concentração de 2% e a testemunha,

respectivamente (Figura 1). Para o fator tempo de incubação, não houve diferença estatística a 5% de probabilidade (Figura 2). Souza & Campos (1998) descreveram métodos similares ao estudar a quantificação de endósporos de *P. penetrans* em raízes de tomateiro secas e moídas por maceração enzimática, maceração e diluição e observaram que o método de maceração enzimática, usando uma solução de 2% de pectinase-celulase (Sigma Chemicals) por 3 h de incubação a 37°C, permitiu detectar mais endósporos/g de pó de raiz que os demais métodos testados. Sharma & Stirling (1992) utilizando a enzima Clariphase® a 4% (Produto comercial da enzima pectolítica), obtiveram 247,7% de aumento na detecção de endósporos em raízes moídas quando comparado aos demais métodos estudados no trabalho, inclusive com o método padrão de detecção de endósporos em raízes secas e moídas, utilizado por Stirling & Wachtel (1980). A eficiência na detecção do número de endósporos/g de pó de raiz utilizando as enzimas liofilizadas produzidas pelo fungo *P. griseoroseum* no trabalho, foi 250% superior aos resultados obtidos por Souza & Campos (1998) e 44% superior aos resultados obtidos por Stirling & Wachtel (1980), mas talvez as raízes do inóculo estivessem mais infectadas por *P. penetrans*, não significando que as enzimas usadas no trabalho são melhores que dos outros autores.

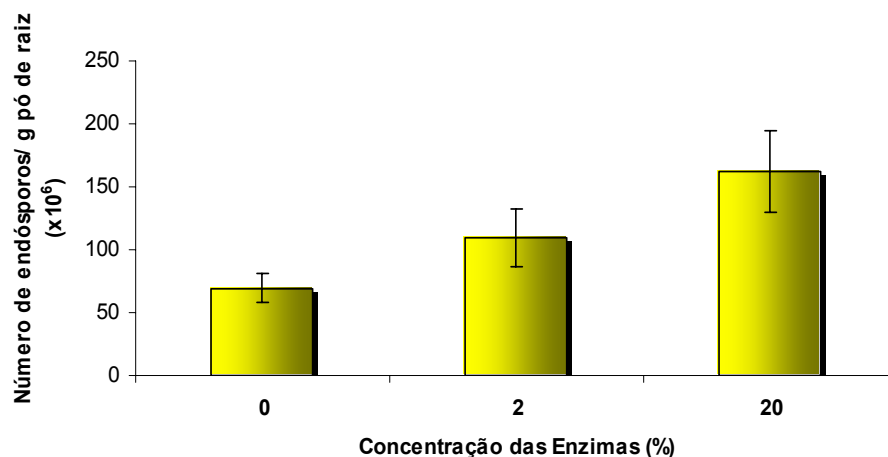


Figura 1 - Número de endósporos de *Pasteuria penetrans* produzidos em raízes de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de enzimas liofilizadas, obtidas de *Penicillium griseoroseum*. As barras representam o intervalo de confiança, associado ao teste T a 5% de probabilidade. CV= 1,40%. Dados originais transformados para Log X.

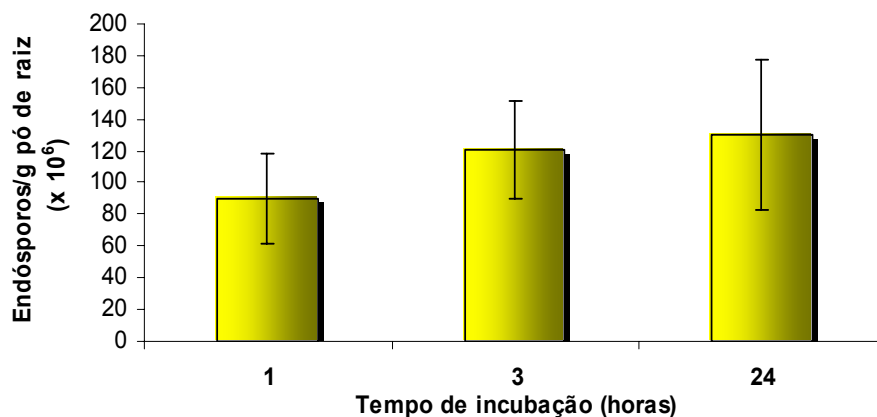


Figura 2 - Número de endósporos de *Pasteuria penetrans* produzidos em raízes de tomateiro tratadas em diferentes tempos de incubação da enzima liofilizada, obtidas de *Penicillium griseoroseum*. As barras representam o intervalo de confiança, associado ao teste T a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação= 2,24%. Dados originais transformados para LogX.

Chen *et al.* (1996), ao testarem outros métodos usados para quantificação de endósporos/g de pó de raiz, observaram que os melhores métodos testados foram os de maceração em almofariz (83,7 milhões de endósporos/g de pó de raiz) e o método de diluição (79 milhões de endósporos/g de pó de raiz) seguidos dos métodos de incubação (47,7 milhões de endósporos/g de pó de raiz), digestão enzimática utilizando a enzima citolase a 12,5% durante três dias (32 milhões de endósporos/g de pó de raiz) e o método de centrifugação (12,7 milhões de endósporos/g de pó de raiz). Muito provavelmente, se estes autores tivessem aliado a digestão enzimática à maceração em almofariz, como nesse estudo, poderiam ter obtido melhor resultado, pois tanto a degradação enzimática do tecido, quanto o atrito da maceração mecânica contribuem para a liberação dos endósporos, o que facilita grandemente a sua detecção visual em microscópio. Nesse trabalho, conclui-se que o tempo de incubação de 1 h nas enzimas de *P. griseoroseum* foi o suficiente para incrementar a quantificação de endósporos no inóculo de pó de raiz (Figura 2).

2- Efeito das enzimas na adesão dos endósporos de *P. penetrans* em juvenis de segundo estágio de *M. javanica*

Endósporos de *P. penetrans*, provenientes de fêmeas extraídas por digestão enzimática, apresentaram maior capacidade de adesão em J2 de *M. javanica* pelo teste F ($P \leq 0,05$), quando comparados aos da testemunha (fêmeas extraídas manualmente) (Tabela 1). Maximiniano *et al.* (2001), ao testarem o efeito direto da pectinase e celulase sobre endósporos de *P. penetrans* na adesão em três ensaios, verificaram que a enzima comercial pectinase (SIGMA P-9179 de *Aspergillus niger* 1,0 U/mg) reduziu a adesividade dos endósporos, enquanto a enzima comercial celulase (SIGMA C-1184 0,45 U/mg) não afetou a adesão de endósporos em J2 de *M. javanica*. O tempo de incubação ou as concentrações da pectinase foram indiferentes sobre a adesão de endósporos em J2, sendo que o efeito a enzima teve efeito na adesão tanto ao tratar endósporos quanto ao tratar J2; porém, foi mais intenso quando ambos foram expostos a enzima celulase (Maximiniano *et al.*, 2001). Ratnasoma *et al.* (1991) observaram que o efeito direto da pectinase nos endósporos de *P. penetrans* afetou a adesão de endósporos à cutícula de J2 de *M. javanica*. Os autores sugeriram que houve um desprendimento de endósporos em J2 de *M. javanica* com o uso de pectinase, devido à degradação de algum componente de reconhecimento e adesão.

Tabela 1 - Efeito de enzimas na adesão dos endósporos de *Pasteuria penetrans* em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne Javanica*

Tratamentos	Média do número de endósporos aderidos em 20 J2
1-Extração manual	4,75*
2-Extração enzimática	6,42*
CV (%)	13,53

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Davies & Danks (1993) observaram que a pré-incubação de endósporos de *P. penetrans* em enzimas muramidase, cujo substrato é o ácido N-acetil murâmico, também reduziu a adesividade. Rocha & Campos (2000), ao avaliarem o efeito de filtrados fúngicos na adesão de endósporos de *P. penetrans* em J2 de *M. incognita*, observaram que endósporos incubados em filtrados fúngicos de *Paecilomyces lilacinus* e *Arthrobotrys conoides* por cinco dias, tiveram menor adesão que aqueles incubados em meio Czapek e água (testemunha). De acordo com os autores, essa redução na adesão pode ser devido a substâncias químicas produzidas no meio por esses fungos ou ao pH dos filtrados.

O aumento de adesão, nesse trabalho, talvez tenha ocorrido pela pequena quantidade de enzimas de *P. griseoroseum* que pode ter adentrado o corpo de algumas fêmeas por aberturas naturais como o ânus e a vulva, assim como por pequenas fissuras na região do pescoço, e essa pequena quantidade de enzimas pode ter causado uma limpeza nos endósporos ou mesmo tenha tido algum efeito sobre os esporângios, rompendo-os e liberando os endósporos, o que aumentaria sua capacidade de adesão.

3- Efeito de enzimas na reprodução de endósporos de *P. penetrans* em fêmeas de *M. javanica*

Não houve efeito da enzima liofilizada produzida pelo fungo *P. griseoroseum* sobre a reprodução de *P. penetrans* em fêmeas de *M. javanica*, sobre número de galhas e sobre o número de ovos em relação à testemunha (Tabela 2).

Vários fatores abióticos podem afetar a relação entre *P. penetrans* e o nematóide hospedeiro; contudo alguns aspectos desse sistema têm sido estudados. A temperatura, a umidade do solo, o tipo de solo e o pH são os fatores que mais afetam a relação entre *Pasteuria* spp. e o nematóide hospedeiro. A adesão decresce com o pré-tratamento de 45°C ou mais, até ser mínima depois de incubação em 50°C por 10 dias. Provavelmente a redução da adesão aos J2 esteja ligado à solubilização ou desnaturação de ligantes presentes na cutícula do nematóide (Freitas & Carneiro, 2000). Nesse estudo, a incubação a 40°C se deu por apenas 24 h, portanto, tempo e temperatura insuficientes para provocar redução em sua capacidade adesiva. A adesão de endósporos de *P. penetrans* à cutícula de J2 não é afetada por pH entre 4,5 e 8,5, fato observado por diversos autores, portanto o papel do pH necessita de mais estudos (Freitas & Carneiro, 2000).

Tabela 2 - Efeito de enzimas na reprodução *Pasteuria penetrans*, no número de galhas e ovos de *Meloidogyne javanica*

Tratamentos	Número de endósporos de <i>P. penetrans</i> ^a	Número de galhas ^b	Número de ovos ^c
1-Extração manual	4.885000 ^{ns}	371,2 ^{ns}	8.084,4 ^{ns}
2-Extração enzimática	5.679500 ^{ns}	321,8 ^{ns}	8.384 ^{ns}
CV (%)	45	31	33

ns = não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

a = Esporos de 20 fêmeas/ repetição, média de 10 repetições.

b = Média de 10 repetições.

c = Média de 10 repetições.

Literatura Citada

- BONETTI, J.I. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 3 (6): 553.
- CAMPOS, V.P., J. T. SOUZA DE & R. M. SOUZA DE. 1998. Controle de Fitonematóides por meio de bactérias. In: W.C. Luz (Ed.) *Revisão Anual de Fitopatologia de Plantas*. Passo Fundo. pp. 285-327.
- CHEN, Z.X., D.W. DICKSON, & T.E. HEWLETT. 1996. Quantification of endospore concentrations of *Pasteuria penetrans* in tomato root material. *Journal of Nematology*, 28(1): 50-55.
- 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.
- DICKSON, D.W.; M. OOSTENDORP; R.M. GIBLIN-DAVIS & D.J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: D. Rosen, F.D. Bennett & J. L. Capinera (Ed.) *Pest management in the subtropics Biological Control Florida*. London. Intercept. pp. 575-601.
- EUCLIDES, R. F. 1983. Sistema para análise estatística e genética. SAEG. Viçosa, UFV, 57p.

- 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.
- FREITAS, L.G. & R.M.D.G. CARNEIRO. 2000. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria penetrans* spp. In: J.L. Azevedo (Ed.) *Controle Biológico*. Jaguariúna-SP. pp. 91-125.
- HUSSEY, R.S. & , K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57(12): 1025-1028.
- MAXIMINIANO, C.; V.P. CAMPOS & R.M. SOUSA DE. 2001. Efeitos de enzimas na adesão de endósporos, e de raças de *Meloidogyne incognita* na infectividade de *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira*, 25(1): 27-34.
- RATNASOMA, H.A.; S.R. GOWEN & N.G.M. HAGUE. 1991. Observation on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp.. *Nematologia Mediterranea* 19(2): 225-227.
- RATNASOMA, H.A. & S.R. GOWEN. 1996. Spore attachment of *Pasteuria penetrans* on juvenis of *Meloidogyne incognita* as affected by pH and organic matter. *Nematologia Mediterranea* 24(2): 283-285.
- ROCHA, F.S., & V.P. CAMPOS. 2000. Efeito de filtrados fúngicos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* e na infectividade e parasitismo de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* 24 (2): 239-244.
- SHARMA, R.D. & G.R. STIRLING. 1992. A method for the extraction and quantification of *Pasteuria penetrans* spores in root material. *Fitopatologia Brasileira* 18(1):110-111.
- SOUZA, J.T. DE & V.P. CAMPOS. 1998. Quantificação de endósporos de *Pasteuria penetrans* em solo e raízes. *Nematologia Brasileira* 22(1): 22-31.
- 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.; R.D. SHARMA & J. PERRY. 1990. Attachment of *Pasteuria penetrans* spore to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. *Nematologica* 36: 246-252.
- STIRLING, G. R. 1991. Biological control of plant-parasite nematodes; progress, problems and prospects. *Melksham Redwood Press*. 282 p.

CONCLUSÕES GERAIS

Ao testar a eficiência das enzimas produzidas pelos fungos *A. niger*, *P. griseoroseum* e *P. italicum* e combinações a 50% dessas enzimas na liberação de fêmeas de *M. javanica* por maceração enzimática, foi possível observar que as enzimas produzidas pelo fungo *P. griseoroseum* foram as mais eficientes na liberação de fêmeas em raízes de tomateiro, equiparando-se às enzimas comerciais importadas. As atividades enzimáticas obtidas por *P. griseoroseum* foram: xilanase, 2,42 U/mL; pectinase, 1,23 U/mL e celulase, 0,05 U/mL.

Das concentrações enzimáticas testadas na liberação de fêmeas de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, a concentração de 200 U/mL da enzima liofilizada produzida por *P. griseoroseum* foi a que liberou mais fêmeas das raízes com galhas de plantas de tomateiro.

Ao testar o efeito de enzimas de *P. griseoroseum* na identificação de espécies de *Meloidogyne* extraídas por maceração enzimática na concentração de 200 U/mL, observou-se que as fêmeas incubadas a 40°C com as enzimas pectinolíticas, xilanolíticas e celulolíticas, quando submetidas à eletroforese não geraram as bandas características de cada espécie, mas quando elas foram incubadas a 35°C, as bandas, estavam muito fracas, sugerindo assim que as enzimas, ou mais provavelmente a temperatura de incubação à que as fêmeas foram expostas, influenciou a revelação das bandas impedindo a identificação de espécies por eletroforese de isoenzimas.

A enzima de *P. griseoroseum* na concentração de 20%, independente do tempo de incubação, apresentou maior eficiência na quantificação dos endósporos de

P. penetrans em pó de raiz do que a 2%. Em relação à adesão dos endósporos, aqueles obtidos de fêmeas extraídas por digestão enzimática, apresentaram maior adesão em J2 de *M. javanica* em relação à testemunha.

Não houve efeito da enzima liofilizada produzida pelo fungo *P. griseoroseum* sobre a reprodução de *P. penetrans* em fêmeas de *M. javanica*, sobre o número de galhas ou de ovos, comparado com a testemunha.