

Efeito de Exsudatos Radiculares em Endósporos de *Pasteuria penetrans* e em Juvenis do Segundo Estádio de *Meloidogyne incognita**

Fernando da Silva Rocha**, Vicente P. Campos & Ricardo Magela de Souza

Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Cx. Postal 37, Lavras, MG, fax (035) 3829-1283, e-mail: rocha.fs@bol.com.br

(Aceito para publicação em 22/09/2004)

Autor para correspondência: Fernando S. Rocha

ROCHA, F.S., CAMPOS, V.P. & SOUZA, R.M. Efeito de exsudatos radiculares em endósporos de *Pasteuria penetrans* e em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. Fitopatologia Brasileira 29:644-650. 2004.

RESUMO

Juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* foram incubados nos exsudatos radiculares de soja (*Glycine max*), tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), mostarda (*Brassica rapa*), *Crotalaria juncea* e *C. spectabilis* e em água por 12 h. Em seguida, realizou-se o teste de adesão por centrifugação ou por borbulhamento. Em outro ensaio, endósporos de *Pasteuria penetrans* foram incubados por quatro dias a 26 °C nos exsudatos e submetidos à adesão em J2 de *M. incognita*, sob borbulhamento constante por 24 h em tubos contendo água. Os J2 com endósporos aderidos pelo teste de borbulhamento foram inoculados em mudas de tomateiro. Verificou-se que a incubação dos J2 por 12 h nos exsudatos radiculares testados reduziu o número de endósporos de *P. penetrans* por J2 independentemente do método de adesão empregado. Os J2 incubados nos exsudatos radiculares testados proporcionaram menor

número de fêmeas parasitadas em tomateiro em relação à testemunha (água), bem como menor número de galhas com exceção dos J2 incubados em exsudato do próprio tomateiro. A reprodução dos J2 incubados nos exsudatos radiculares não foi afetada quando comparada à testemunha. A incubação dos endósporos nos exsudatos das plantas testadas reduziu a adesão e a infetividade em J2, em relação à testemunha. Após 28 dias da inoculação, observou-se redução no número de fêmeas parasitadas resultantes da infecção desses J2 com endósporos incubados em exsudatos radiculares comparada com aqueles incubados em água. O parasitismo do J2 com endósporos tratados com exsudatos radiculares e a reprodutividade de fêmeas oriundas da infetividade desses J2 foram semelhantes aos incubados em água.

Palavras-chave adicionais: parasitismo, infetividade, controle biológico, nematóide de galhas, bactéria.

ABSTRACT

Effect of root exudates on endospores of *Pasteuria penetrans* and on second-stage juvenile of *Meloidogyne incognita*

In one assay, second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne incognita* were incubated in root exudates of soybean (*Glycine max*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), coffee (*Coffea arabica*), bean (*Phaseolus vulgaris*), mustard (*Brassica rapa*), *Crotalaria juncea* and *C. spectabilis* and in water for 12 h, followed by endospores adhesion by centrifugation or by air bubbling. In another assay, endospores of *Pasteuria penetrans* were incubated for four days at 26 °C in the exudates and submitted to adhesion on J2 of *M. incognita* by constant air bubbling for 24 h in tubes containing water. The J2 with endospore adhesion by air bubbling were inoculated in tomato seedlings. The incubation of J2 for 12 h in the root exudates reduced

the number of *P. penetrans* endospore per J2, regardless of the adhesion test used, and resulted in fewer parasitized females when compared with the control, as well as a lower number of galls, except in the J2 incubated in exudate of tomato. The reproduction of incubated J2 in the root exudates was not affected when compared to the control. The endospore incubation in the exudates of the tested plants reduced the adhesion and the infectivity of these endospores to J2 in relation to the control. After 28 days from inoculation, reduction was observed in the number of parasitized females resulting from infection of those J2 with endospore incubated in exudates when compared with those incubated in water. The parasitism of J2 with endospore treated with exudates and the reproduction of infected J2 females were similar to those incubated in water.

INTRODUÇÃO

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* possuem uma relação parasitária com as raízes de diversas plantas, além de patogênica para muitas culturas, causando enormes prejuízos à agricultura brasileira e mundial (Lordello, 1984; Luc *et al.*, 1990). Esse parasitismo não ocorre, contudo, em algumas

plantas, sendo estas então empregadas como medidas de controle (Ferraz & Valle, 1997; Costa *et al.*, 2000; Santiago *et al.*, 2001). Em algumas delas ocorrem em seus exsudatos substâncias nematicidas e nematostáticas a juvenis do segundo estágio (J2), levando-os à morte ou reduzindo sua mobilidade (Gommers, 1981; Campos *et al.*, 2002). Em outras plantas, entretanto, essas substâncias encontram-se pré-formadas em seus tecidos (Badra *et al.*, 1979; Nogueira *et al.*, 1994) sendo liberadas quando a planta é incorporada ao solo. O exsudato e os tecidos das plantas em decomposição servem também

*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras (2003).

** Bolsista da CAPES

como fonte de alimento para muitos organismos do solo, além de afetar fases do ciclo das relações entre eles (Guckert, 1992; Siqueira, 1997). Um desses organismos é a bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne, 1940) Sayre & Starr, 1995, cuja adesão do endósporo em J2 de *Meloidogyne* spp. é inibida por metabólitos secundários de fungos e bactérias (Rocha & Campos, 2000; Maximiniano *et al.*, 2001d). A aderência desse endósporo ao J2 de *Meloidogyne* spp. constitui o início do ciclo de vida da bactéria além de propiciar a continuação desse ciclo através de gerações do nematóide. Por isso, a natureza desse processo de adesão tem sido investigada por muitos pesquisadores (Stirling *et al.*, 1986; Ratnasoma *et al.*, 1991; Davies & Danks, 1993; Spiegel *et al.*, 1996). Maximiniano *et al.* (2001b) verificaram que solo argiloso e substrato de folhas moídas de *Crotalaria juncea* L. reduziram a adesão de endósporos de *P. penetrans* a J2 de *M. javanica* (Treub) Chitwood. Rocha & Campos (2000) e Maximiniano *et al.* (2001d) verificaram que filtrados fúngicos de *Arthrobotrys conoides* Drechsler e *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson e de rizobactérias antagonicas a *Meloidogyne* spp. reduziram a adesão do endósporo de *P. penetrans* em *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica*, respectivamente. Freitas *et al.* (2000) observaram que a incorporação de folhas de repolho ao solo, seguido de incubação a 50 °C por dez dias afetaram a formação de endósporos no interior da fêmea de *M. arenaria* (Neal) Chitwood.

Para encontrar o endósporo de *P. penetrans* no solo o J2 de *Meloidogyne* spp. precisa movimentar-se em sua direção, o que pode ser influenciado, entre outros, por produtos da degradação de tecidos de plantas e pelos exsudatos radiculares afetando talvez a interação *P. penetrans*-*Meloidogyne* spp., porém, esse efeito ainda não foi estudado. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito de exsudatos radiculares de diversas plantas em juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* e nos endósporos de *P. penetrans* e na adesão e infetividade desse nematóide.

MATERIAL E MÉTODOS

Desinfestação das sementes

Sementes de mostarda (*Brassica rapa* L.), café (*Coffea arabica* L.) cv. Rubi, feijão (*Phaseolus vulgares* L.) cv. Carioca, *C. juncea* e *C. spectabilis* L. foram colocadas em copos de 250 ml contendo solução de sulfato de estreptomicina 1% e uma gota de Tween 80%. No caso das sementes de café, o pergaminho foi retirado antes do tratamento acima descrito. Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Kada e de soja (*Glycine max* L.) cv. Doko-RC foram tratadas por 5 min e as demais por 30 min, como descrito acima. A seguir, a solução de sulfato de estreptomicina foi descartada e adicionada solução de hipoclorito de sódio 1% sobre as sementes, de modo a ficarem imersas. Sementes de café, feijão, tomate e soja ficaram imersas por 1 min e as demais por 30 min. A seguir, procedeu-se à lavagem por quatro vezes consecutivas com água destilada e esterilizada para retirar o excesso do hipoclorito de sódio.

Obtenção das plântulas

Após a desinfestação superficial, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram distribuídas em bandejas plásticas, previamente desinfestadas com álcool 95%, as quais continham areia passada em peneira de aberturas de malhas 0,850 mm e esterilizada através da tríplice autoclavagem a 120 °C por 30 min. A seguir, as bandejas foram vedadas com filme plástico (rolopack®) e transferidas para câmara climatizada com 14 h de luz e 10 h de escuro à temperatura de 28 ± 2 °C, para permitir a germinação. As plantas foram utilizadas para obtenção do exsudato radicular em diferentes idades de acordo com a abundância de raízes observada visualmente (Tabela 1).

Extração dos exsudatos radiculares das plântulas

As plântulas foram retiradas cuidadosamente das bandejas, em câmara de fluxo laminar, e as raízes foram separadas da parte aérea com bisturi e transferidas para placa de Petri contendo papel de filtro estéril e umedecido com água destilada e esterilizada. As plântulas de café utilizadas para extração do exsudato radicular encontravam-se no estágio de palito de fósforo. Para obtenção dos exsudatos radiculares das plantas testadas (Tabela 1), utilizou-se a técnica adaptada de Campos *et al.* (2002). Para isso, as raízes foram colocadas em tubo plástico cônico de 45 mm de altura por 10 mm de diâmetro superior e 4 mm de diâmetro inferior, o qual foi seccionado na parte inferior e recoberto com membrana Millipore de 10,0 µm de diâmetro de poro. Todo o conjunto foi encaixado pela parte do menor diâmetro noutro tubo de 10 mm de diâmetro. Em seguida, o tubo superior contendo as raízes foi vedado em sua extremidade e todo o conjunto formado pelos dois tubos acoplados foi centrifugado a 1.890 g por 10 min. Na centrifugação, o exsudato radicular passou pela membrana Millipore sendo coletado no tubo inferior e daí retirado com pipeta automática de 1,0 ml e diluído para a concentração de 1:10. Esse exsudato radicular diluído foi passado em membrana Millipore de 0,22 µm de diâmetro de poro, obtendo-se assim solução estéril, sendo então armazenado no escuro a -4 °C, em refrigerador, até sua utilização.

TABELA 1 -Idade das plântulas das diversas espécies vegetais usadas na obtenção do exsudato radicular, pH dos exsudatos e número de plântulas necessárias para obtenção de 1 ml de exsudato

Espécies vegetais	Idade das plântulas (dias)	Nº de plântulas / 1 ml de exsudato	pH
Soja	7	56	7,50
Tomate	13	132	7,38
Café	28	30	6,20
Feijão	8	25	6,49
Mostarda	8	140	5,78
<i>C. juncea</i>	6	57	6,65
<i>C. spectabilis</i>	8	55	7,62

Obtenção de mudas de tomateiro

Sementes de tomateiro, cv. Kada, do grupo Santa Cruz, foram semeadas em bandejas contendo substrato Plantmax e mantidas em casa de vegetação. Mudas saudáveis e de tamanho ideal para o transplante e montagem dos ensaios foram obtidas 35 dias após a semeadura.

Obtenção dos endósporos de *Pasteuria penetrans*

Os endósporos de *P. penetrans*, isolado PP₁₂ originário do município de Ijaci, MG, foram multiplicados em raízes de tomateiros cultivados em vasos ou bandejas mantidos em casa de vegetação. As raízes de tomateiro foram separadas do substrato, lavadas em água, cortadas em pedaços de 2 cm e embebidas por 24 h em solução enzimática composta de 4,0 ml de pectinase-SIGMA P-9179 e 4,0 g de cellulase-SIGMA C-1184. A seguir, as raízes foram trituradas em liquidificador por 40 s e vertidas em peneira de 0,84 mm sobre peneira de 0,025 mm, coletando-se o material retido nessa última peneira em Erlenmeyer de 2 l. As fêmeas de *M. incognita* contidas nesse material foram retiradas com o auxílio de um estilete de ponta recurvada e colocadas em tubo de ensaio contendo solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0. Essas fêmeas parasitadas por *P. penetrans* foram esmagadas em 2 ml de água destilada, em triturador de tecidos (Pyrex 7727-15) previamente lavado com leite desnatado e enxaguado com água destilada. Esse procedimento foi realizado para todos os recipientes em contato com os endósporos. Essa suspensão de *P. penetrans* foi passada por peneira de 0,028 mm para retirada de restos de fêmeas e/ou ovos, obtendo-se uma suspensão límpida de endósporos quantificada através de câmara de Neubauer e armazenada a 8 °C em câmara fria. Essa suspensão foi pré-tratada em sonificador durante 20 min, antes do teste de adesão.

Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Raízes de tomateiros cv. Kada cultivadas em casa de vegetação e infestadas com *M. incognita*, foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de aproximadamente um centímetro. Os ovos foram obtidos conforme técnica de Hussey & Barker (1973). Ao final, o material retido na peneira de 0,025 mm foi recolhido com o auxílio de jatos de sacarose (0,5 g/ml), em tubos de plástico de 50 ml. Em seguida, colocaram-se aproximadamente 3 g de caulim nesses tubos, que foram agitados para colocar em suspensão todo o precipitado e, a seguir, centrifugados por 60 s a 680 g. Transcorrido esse tempo, derramou-se o sobrenadante numa peneira de 0,025 mm, sem agitar o precipitado. Recolheram-se os ovos retidos na peneira em bquer de 200 ml, utilizando-se piseta contendo água destilada. Em câmara de fluxo laminar, toda a suspensão foi lavada por quatro vezes em água destilada e esterilizada, utilizando-se peneira desinfestada de 0,025 mm e, então, colocada em bquer de vidro esterilizado. Para a obtenção dos J2, utilizou-se câmara de eclosão formada com tela e papel celulose de lenços duplos de 14,8 x 21,5 cm (Klin®) montada em funil de vidro esterilizado.

Montagem e avaliação dos ensaios

No primeiro ensaio, os J2 de *M. incognita*, obtidos conforme descrito anteriormente, foram recolhidos no terceiro dia, quantificados em microscópio de objetiva invertida e separados em oito porções para a montagem do ensaio empregando-se exsudatos radiculares de sete plantas (Tabela 1) e água como testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Cada porção de J2 foi vertida sobre peneira formada de tela Millipore de 11 µm de diâmetro de poro e recolhida em 500 µl de solução de exsudato radicular diluído 1:10 (exsudato: água) de cada planta (Tabela 1) ou água (testemunha), para tubos de eppendorf com capacidade para 1,5 ml, e em seguida incubada por 12 h a 26 °C no escuro. Após a incubação, os J2 foram vertidos sobre peneira formada de tela Millipore de 11 µm para retirar-se o exsudato e recolhidos com água destilada para outro tubo de eppendorf. Para o teste de adesão dos endósporos, utilizou-se o método de centrifugação (Hewlett & Dickson, 1993) com modificações. Para isto, 500 µl de água destilada contendo 100 J2 foram adicionados em tubos de eppendorf, juntamente com 150 µl da suspensão de endósporo de *P. penetrans* na concentração de $1,2 \times 10^6$ endósporos/ml. Após a centrifugação dos tubos a 800 g por 3 min a 30 °C, transferiu-se o conteúdo dos tubos para caixa de contagem. Em microscópio de objetiva invertida com aumento de 250x, quantificou-se o número de J2 com endósporos aderidos, para o cálculo de percentagem de adesão, e o número de endósporo/J2.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Hartley (Banzatto & Kronka, 1995), no qual se verificou a homocedasticidade. Em seguida, foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias.

No segundo ensaio, os J2 de *M. incognita* foram incubados nos exsudatos radiculares das sete plantas testadas (Tabela 1) e na água como testemunha por 12 h, à semelhança do ensaio anterior. A seguir foram recolhidos em solução tampão de fosfato de sódio 0,05M e pH 7,0 e colocados em tubo de vidro de 145 mm de altura por 14 mm de diâmetro. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e cinco repetições. Adicionaram-se 2 ml de uma suspensão de endósporos de *P. penetrans* com $1,2 \times 10^6$ endósporos/ml, em cada tubo contendo 1.000 J2 de *M. incognita* pré-tratados com exsudato radicular como descrito anteriormente, completando-se o volume final dos tubos para 12 ml com solução tampão. Em seguida, mangueira plástica ligada à bomba de aquário foi inserida no tubo com sua extremidade imersa na suspensão de juvenis e endósporos para borbulhamento constante por 24 h. Ao final desse tempo, o conteúdo de cada tubo foi passado em peneira de 0,037 mm e lavado em água corrente para a retirada dos endósporos não aderidos ao J2. Para quantificação dos endósporos aderidos, os J2, em número de 20, escolhidos ao acaso, por tubo, foram observados em microscópio de objetiva invertida no aumento de 250x, contando-se o número de endósporos aderidos por J2 e o número de J2 com endósporos aderidos

para o cálculo de percentagem de adesão. A análise de variância e o teste de médias foram semelhantes ao ensaio anterior.

No terceiro ensaio, 5 ml de uma suspensão de endósporo de *P. penetrans* na concentração de $2,8 \times 10^7$ endósporos/ml foram centrifugados a 800 g por 10 min, em tubos de 20 ml, com os endósporos formando o precipitado. O sobrenadante foi removido com pipeta automática. Utilizaram-se exsudatos radiculares de diversas plantas (Tabela 1). Cinco mililitros desses exsudatos foram diluídos 1:10 (exsudato: água) e neles foram ressuspensos os endósporos e incubados por quatro dias à temperatura de 26 °C. Na testemunha os endósporos foram incubados em água. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições. Ao final desse tempo, foram feitas duas novas centrifugações: a primeira para retirar o exsudato radicular e a outra para promover a lavagem dos endósporos com água destilada, na mesma velocidade anteriormente citada. Os endósporos ainda dentro dos tubos foram ressuspensos em aproximadamente 1 ml de água destilada, sendo adicionados em cada tubo 1.000 J2 de *M. incognita*, inserindo-se uma mangueira plástica ligada à bomba de aquário para borbulhamento constante da suspensão por 24 h. A seguir, o conteúdo de cada tubo foi passado em peneira de 0,037 mm e lavado em água corrente para a retirada dos endósporos não aderidos aos J2. Em vinte J2 escolhidos ao acaso, por tubo, foi contado em microscópio de objetiva invertida, aumento de 250x, o número de endósporos/J2 e o número de J2 com endósporos. A análise de variância e o teste de médias foram semelhantes ao ensaio anterior.

No quarto ensaio, 1.000 J2 de *M. incognita* após incubação por 12 h em exsudato radicular de cada uma das sete plantas estudadas (Tabela 1) e em água (testemunha), seguida da adesão com endósporos de *P. penetrans*, ou com 1.000 J2 de *M. incognita* com endósporos aderidos e tratados com os mesmos exsudatos radiculares foram inoculados em mudas de tomateiro colocadas em copos plásticos de 300 ml de volume contendo substrato na proporção 1:1 (solo: areia). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos e oito repetições. Para inoculação, esses J2 foram dispersos em 4 ml de água e colocados em 4 furos de ± 3 cm de profundidade ao redor das mudas. A seguir, os copos foram colocados em sala climatizada com temperatura de 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 h de luz e mantidos nessas condições durante 28 dias. Ao final desse tempo, cortou-se a parte aérea e retirou-se, cuidadosamente, o sistema radicular do solo em água parada num balde de 15 l. Em seguida, foram extraídas quarenta fêmeas por tratamento e esmagadas em lâminas. Em microscópio de objetiva invertida, aumento de 500x, contou-se o número de fêmeas parasitadas. Consideraram-se parasitadas todas aquelas com endósporos encontrados no seu interior. A seguir, todo o sistema radicular foi colocado em solução de Floxina B 0,0015% por 15 min, colorindo-se de vermelho as massas de ovos dos nematóides. Após a coloração, as raízes foram deixadas sobre papel toalha por 10 min, possibilitando assim a avaliação do peso da matéria fresca das raízes, seguida da contagem do número de massas de

ovos e de galhas por sistema radicular. Para quantificação do número de ovos por sistema radicular, as raízes foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm de comprimento e os ovos obtidos pela técnica de Hussey & Barker (1973). Em microscópio de objetiva invertida estimou-se o número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular. Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x + 0.5}$ para análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito na adesão e na infetividade de endósporos de *P. penetrans* sobre J2 de *M. incognita* incubados nos exsudatos radiculares

Todos os exsudatos radiculares testados em que se incubaram os juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* por 12 h reduziram ($P \leq 0,05$) o número de endósporos de *P. penetrans*/J2, percentagem de adesão e de fêmeas infetadas em comparação à testemunha água (Figuras 1, 2 e 3). Os exsudatos das plantas testadas (Tabela 1) reduziram ($P \leq 0,05$) a adesão dos endósporos em J2 independentemente da técnica usada para promover essa adesão, qual seja centrifugação ou borbulhamento (Figuras 1 e 2). Os J2 incubados nos exsudatos das plantas testadas causaram menor número de galhas em tomateiros comparados à testemunha (água), com exceção dos J2 incubados em exsudatos de tomateiro (Figura 4). A reprodutividade em tomateiro (número de ovos/ massa de ovos por grama de raiz) dos J2 incubados nos exsudatos das plantas de café (652/ 6), mostarda (595/ 8) e *C. juncea* (769/ 9), não diferiram da testemunha (816/ 10).

A incubação de J2 nos exsudatos deve ter causado alterações na cutícula desse nematóide afetando algum promotor da adesão dos endósporos, ainda desconhecido. Spiegel *et al.* (1996) verificaram que o pré-tratamento dos J2 de *M. javanica* com o detergente dodecil sulfato de sódio, lectinas concavalina A e aglutamina do germe do trigo reduziram a adesão dos endósporos à cutícula dos J2. Outras substâncias como enzimas (quitinase, muramidase, proteinase K, pepsina A, lipase, hialuronidase, α -glucosidase, celulase), ácido siálico e açúcares (fucose ou α -metil manosídeo, N-acetil-D-glucosamina, D-xilose), quando empregadas na incubação do J2 de *Meloidogyne* sp., diminuíram a adesão dos endósporos de *P. penetrans* (Stirling *et al.*, 1986; Davies & Danks, 1993; Spiegel *et al.*, 1996; Maximiliano *et al.*, 2001a). Substâncias semelhantes podem estar presentes nos exsudatos das plantas. De fato, Rovira (1969) constatou a presença de açúcares (glucose, xilose, ribose, frutose, arabinose, oligosacarídeos, etc), enzimas (protease, amilase, etc), ácidos orgânicos (acético, málico, cítrico, butírico, etc), aminoácidos (leucina, glicina, alanina, ácido glutâmico, ácido aspartico, asparagina, etc) no exsudato de trigo. Essas substâncias também têm sido encontradas em exsudatos de ervilha, aveia, feijão e tomate (Rovira, 1959; Rovira, 1969; Hale *et al.*, 1971; Tanda *et al.*, 1989). A composição diversificada e a quantidade desses exsudatos no solo criam condições

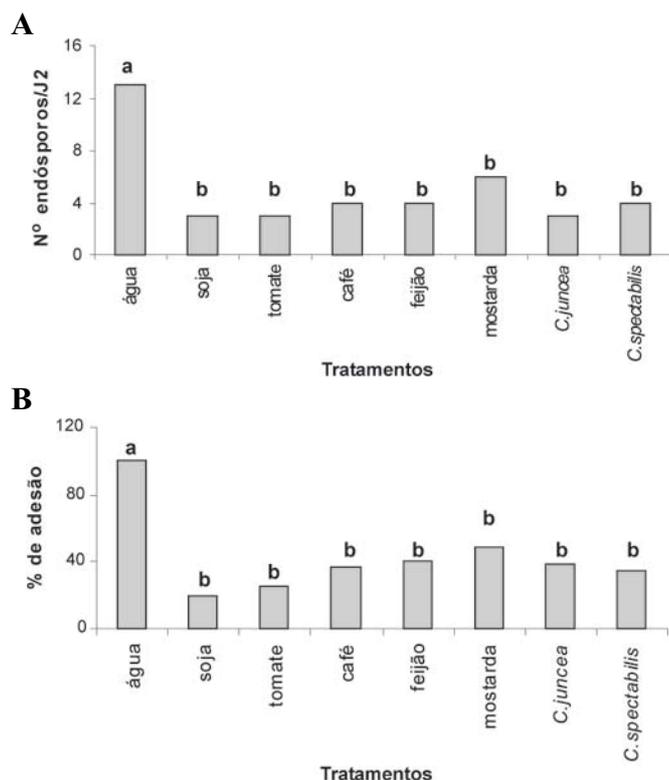


FIG. 1 - Efeito do exsudato radicular de soja (*Glycine max*), tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), mostarda (*Brassica rapa*), *Crotalaria juncea* e *C. spectabilis* sobre juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em incubação por 12 h (ensaio 1), seguido da adesão por centrifugação do endósporo de *Pasteuria penetrans*. A) número de endósporos/J2; B) percentagem de adesão. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

adversas à adesão de endósporos de *P. penetrans* em J2 de *Meloidogyne* sp., diminuindo a eficácia do parasitismo e propiciando que parte da população do nematóide sempre se mantenha livre dessa infecção, além de trazer equilíbrio populacional durante o crescimento da cultura.

A redução na percentagem de adesão dos endósporos no J2 pelo efeito dos exsudatos (Figura 1B), demonstra que a maioria dos indivíduos foi afetada, o que poderia, no campo, diminuir a infetividade de *P. penetrans* em *M. incognita*. De fato, a infetividade dos endósporos foi reduzida quando avaliada pelo número de fêmeas de *M. incognita* infetadas (Figura 3). Tariq et al. (2000) trabalhando com extrato foliar de *Datura stramonium* L. encontraram redução na adesão dos endósporos de *P. penetrans* em J2 de *M. javanica* após aplicação desse extrato em solo infestado pela bactéria. O pré-tratamento de ambos, J2 de *M. javanica* e dos endósporos, com ácido siálico e pectinase, diminuiu a adesão de endósporos de *P. penetrans* em J2 de *M. javanica* (Stirling et al., 1986; Maximiniano et al., 2001a), ratificando a idéia de que na rizosfera o exsudato radicular pode realmente concorrer para diminuir a infetividade de *P. penetrans* em fitonematóides

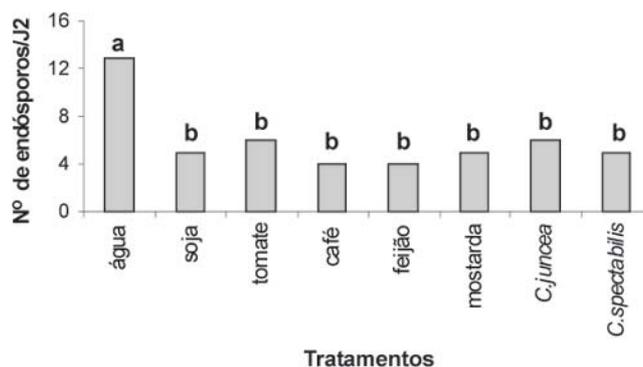


FIG. 2 - Efeito do exsudato radicular de soja (*Glycine max*), tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), mostarda (*Brassica rapa*), *Crotalaria juncea* e *C. spectabilis* na adesão, por borbulhamento durante 24 h, dos endósporos de *Pasteuria penetrans* em juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* após incubação por 12 h nos referidos exsudatos. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

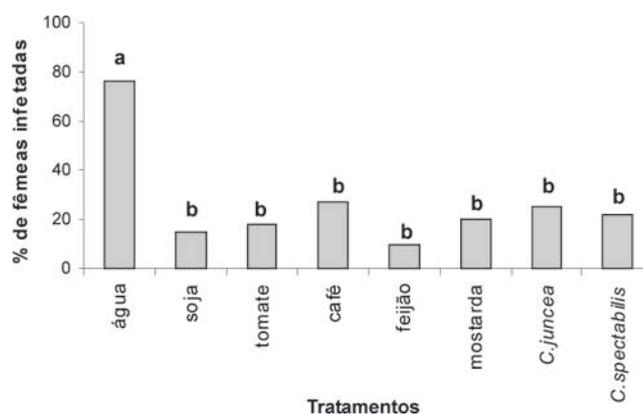


FIG. 3 - Efeito do exsudato radicular de soja (*Glycine max*), tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), mostarda (*Brassica rapa*), *Crotalaria juncea* e *C. spectabilis* em incubação do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por 12 h (ensaio 3), seguido da adesão por borbulhamento durante 24 h dos endósporos de *Pasteuria penetrans*, na infetividade da bactéria. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

como dito anteriormente.

A patogenicidade dos J2 incubados nos exsudatos e infetados por *P. penetrans* também foi diminuída quando se avaliou o número de galhas por grama de raiz de tomateiro (Figura 4).

Efeito de exsudatos radiculares na adesão e infetividade de endósporos de *P. penetrans*

Todos os exsudatos radiculares em que se incubaram os endósporos reduziram ($P \leq 0,05$) o número de endósporos por J2 de *M. incognita* comparados com os incubados em

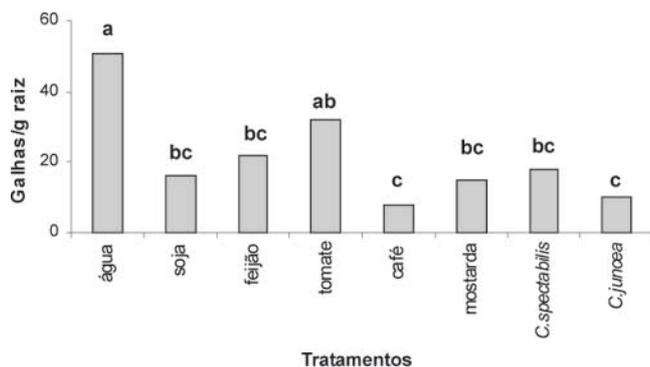


FIG. 4 - Efeito de exsudato radicular de soja (*Glycine max*), tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), mostarda (*Brassica rapa*), *Crotalaria spectabilis* e *C. juncea*, em incubação dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* seguido da adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*, na patogenicidade dos J2 expressa em número de galhas/g de raiz de tomateiro. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

água (Tabela 2). A percentagem de fêmeas infetadas foi menor ($P \leq 0,05$) quando os endósporos foram tratados com exsudatos, comparados com os imersos em água (Tabela 2), cuja relação foi de 2,6 a 4,5 vezes menor. Já a relação entre o número de J2 com endósporos tratados com exsudato e o número de fêmeas infetadas, a partir desses J2, foi de 4,1 a 2,7.

A incubação dos endósporos nos diversos exsudatos testados afetou o processo de adesão nos J2 alterando, talvez, as cargas eletrostáticas. Afolabi *et al.* (1995) constataram a existência de maior rede de cargas negativas na superfície do endósporo em pH neutro e redução dessas cargas negativas em pH afastado do neutro. Maximiniano *et al.* (2001b) trabalhando com folhas moídas de *C. juncea*, verificaram também redução na adesão de endósporos de *P. penetrans* a J2 de *M. javanica*.

A percentagem menor de fêmeas infetadas em relação a J2 infetados com *P. penetrans* indica que muitos J2 na movimentação pelo solo e no processo de penetração libertaram-se dos endósporos devido à fraca adesão ocorrida quando esses endósporos foram tratados com exsudatos. Ratnasoma *et al.* (1991) testaram o efeito da pectinase no desprendimento de endósporos aderidos em juvenis de *M. javanica* e verificaram que cerca de 20% dos endósporos se desprenderam da cutícula dos J2 tratados nessa enzima. A incubação de endósporos de *P. penetrans* em enzimas como muramidase, cujo substrato é o ácido N-acetil-murâmico, e pectinase reduziu a adesividade dos endósporos aos J2 de *Meloidogyne* spp. (Davies & Danks, 1993; Maximiniano *et al.*, 2001a). Além disso, apenas 20 a 30% dos endósporos aderidos à cutícula são capazes de germinar (Sayre & Wergin, 1977; Stirling, 1984). Nesses J2 tratados com exsudatos, o número de endósporos/J2, entre cinco e nove, é o recomendável para o sucesso do parasitismo do J2 na planta. Por outro lado, o número de endósporos/J2, quando incubados em água, foi de 14, isto é, muito elevado, chegando a 100%

de J2 com endósporo, o que reduziu a percentagem de fêmeas infetadas, isto é, 78%, causada pela morte do J2 ou do seu impedimento de penetrar no hospedeiro (Tabela 2). Mais de 11 endósporos aderidos ao J2 diminuem a infetividade desses na planta (Souza & Campos, 1997). Em outro estudo, Davies *et al.* (1988) observaram maiores reduções na penetração, chegando a 86%, quando os J2 de *M. incognita*, contendo 15 endósporos aderidos à cutícula, foram inoculados em raízes de tomateiro.

No campo, o papel do exsudato diminuindo a infetividade do endósporo aderido ao J2, pode prover o equilíbrio entre parasita e hospedeiro mesmo num solo com alto nível de inoculo de *P. penetrans*, onde grande parte dos J2 teria endósporos aderidos. Maximiniano *et al.* (2001c) encontraram 65,25% dos J2 de *Meloidogyne exigua* Goeldi com endósporos aderidos em cafezal naturalmente infestado, contudo, a população do nematóide nunca foi exterminada.

O parasitismo da população de J2 com endósporos aderidos em mudas de tomateiro avaliadas pelo número de galhas/g de raiz foi semelhante em todos os tratamentos, pois esse parasita obrigatório não destrói o hospedeiro (J2), precisando dele como fonte de alimento. A reprodução de *M. incognita* resultante da infecção por endósporos incubados nos exsudatos antes da adesão aos J2, foi também semelhante nos diversos tratamentos, indicando que na população infetante de J2 ocorreu produção semelhante de ovos entre J2 com alto ou baixo número de endósporos/J2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFOLABI, P., DAVIES, K.G. & O'SHEA, P.S. The electrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. *Journal of Applied Bacteriology* 79:244-249. 1995.
- BADRA, T., SALEH, M.A. & OTEIFA, B.A. Nematicidal activity and composition of some organic fertilizers and amendments. *Revue de Nématologie* 2:29-36. 1979.
- BANZATTO, D.A. & KRONKA, S.N. Experimentação agrícola. Jaboticabal: Funep, 1995.
- CAMPOS, H.D., CAMPOS, V.P., RIBEIRO, L.O. & CAMPOS, J.R. Efeito de exsudato radicular de *Brachiaria decumbens* sobre a eclosão e mobilidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira* 27:185-186. 2002. (Resumo).
- COSTA, M.J.N., CAMPOS, V.P., PFENNING, L.H. & OLIVEIRA, D.F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco animais. *Nematologia Brasileira* 24:219-226. 2000.
- DAVIES, K.G. & DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Nematologica* 39:53-64. 1993.
- DAVIES, K.G., KERRY, B.R. & FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology* 112:491-501. 1988.
- FERRAZ, S. & VALLE, L.A.C. Controle de fitonematóides por plantas antagonicas. Viçosa: UFV. 1997.

- FREITAS, L.G., MITCHELL, D.J., DICKSON, D.W. & CHELLEMI, D.O. Soil solarization and organic amendment effects on *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira* 24:133-146. 2000.
- GOMMERS, F.J. Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. *Helminthological Abstracts* 50: 9-21. 1981.
- GUCKERT, A. Significance of roots and their exudates as sources of organic soil substances. *Soil Utilization and Soil Fertility* 4:97-113. 1992. (Abstract).
- HALE, M.G., FOY, C.L. & SHAY, F.J. Factors affecting root exudation. *Advanced Agronomy* 24:89-109. 1971.
- HEWLETT, T.E. & DICKSON, D.W. A centrifugation method for attaching endospores of *Pasteuria* spp. to nematodes. *Journal of Nematology* 25:785-788. 1993.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028. 1973.
- LORDELLO, L.G.E. *Nematóides das Plantas Cultivadas*. 8ª ed. São Paulo: Editora Nobel. 1984.
- LUC, M., SIKORA, R.A. & BRIDGE, J. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford. C.A.B. International. 1990.
- MAXIMINIANO, C., CAMPOS, V.P. & SOUZA, R.M. de. Efeito de enzimas na adesão de endósporos e de raças de *Meloidogyne incognita* na infectividade de *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira* 25:27-34. 2001a.
- MAXIMINIANO, C., CAMPOS, V.P. & SOUZA, R.M. de. Efeito de solo argiloso e substratos orgânico e mineral na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira* 25:15-20. 2001b.
- MAXIMINIANO, C., CAMPOS, V.P., SOUZA, R.M. de. & ALMEIDA, A.R. de. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em cafezal naturalmente infestado por *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira* 25:63-69. 2001c.
- MAXIMINIANO, C., CAMPOS, V.P., SOUZA, R.M. de. & ALMEIDA, A.R. de. Efeito do pH e filtrados bacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira* 25:21-26. 2001d.
- NOGUEIRA, M.A., OLIVEIRA, J.S., FERRAZ, S. & PETERNELLI, L.A. Avaliação da atividade *in vitro* de extratos obtidos da parte aérea de *Mucuna aterrima* em relação a *Meloidogyne incognita* raça 3. *Revista Ceres* 41:506-510. 1994.
- RATNASOMA, H.A., GOWEN, S.R. & HAGUE, N. G.M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. *Nematologia Mediterranea* 19:225-227. 1991.
- ROCHA, F.S. & CAMPOS, V.P. 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* 24:239-244. 2000.
- ROVIRA, A.D. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. *Plant and Soil* 11:53-64. 1959.
- ROVIRA, A.D. Plant root exudates. *The Botanical Review* 35:35-57. 1969.
- SANTIAGO, D.C., HOMECHIN, M., KRZYZANOWSKI, A.A. & CARVALHO, S. de. Efeito antagônico de *Arachis pintoi* sobre *Meloidogyne incognita* raça 2 em solo de mata e solo esterilizado. *Nematologia Brasileira* 25:45-51. 2001.
- SAYRE, R. M. & WERGIN, W.P. Bacterial parasitic of plant nematodes: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology* 129:1091-1101. 1977.
- SIQUEIRA, J. O. *Biologia do solo*. Lavras: MG. UFLA/ FAEPE. Editora UFLA, 1997.
- SOUZA, J.T. de. & CAMPOS, V.P. Efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria penetrans* sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood. *Nematologia Brasileira* 21:93-102. 1997.
- SPIEGEL, Y., MOR, M. & SHARON, E. Attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to the surface of *Meloidogyne javanica* second-stage juveniles. *Journal of Nematology* 28:328-334. 1996.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology* 74:55-60. 1984.
- STIRLING, G.R., BIRD, A.F. & CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie* 9:251-260. 1986.
- TANDA, A.S., ATWAL, A.S. & BAJAJ, Y.P.S. *In vitro* inhibition of root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* by sesame root exudate and its amino acids. *Nematologica* 35:115-124. 1989.
- TARIQ, M., AHMAD, R. & KHAN, S.M. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticle of *Meloidogyne javanica* as affected by leaf extracts of some plants. *Pakistan Journal of Phytopathology* 12:53-55. 2000. (Abstract).