

Métodos de Extração e Quantificação de Endósporos da Bactéria *Pasteuria Penetrans* nas Raízes Moídas de Tomateiro

Ravi Datt Sharma¹
Graham Raymond Stirling²

Introdução

Pasteuria penetrans (Thorne) Sayre & Starr é uma bactéria hiperparasita obrigatória formadora de micélio e endósporos nos nematóides-de-galhas das raízes, *Meloidogyne* spp. e constitui um dos agentes de controle biológico mais promissores, como se observou em solos supressivos na Austrália ([Bird & Brisbane \(1988\)](#)) e na América do Norte ([Minton & Sayre, 1989](#)) e testada, com sucesso, em casa de vegetação ([Sharma, 1992](#)) e em experimentos em que se utilizaram microparcelas no campo (Brown et al., 1985). Na ausência de um método de cultura *in vitro* dessa bactéria, a produção massal e o método de quantificação de endósporos nas raízes moídas, desenvolvido por [Stirling & Wachtel \(1980\)](#), são freqüentemente empregados para produção de inóculo. Para extração e quantificação dos endósporos, Stirling & Wachtel usaram 1 g de pó fino (tamanho de partícula 710 µm) de raízes de tomateiro secadas ao ar utilizando moinho de laboratório (hammermill) e macerado manualmente com um pistilo em 10 mL de água durante

cinco minutos em cadinho de porcelana e diluídas, posteriormente, com água destilada, até o volume de 50 mL. O material macerado foi filtrado utilizando-se de uma peneira de 25 µm, e o filtrado foi diluído com água destilada até o volume de 125 mL. O número de endósporos extraído foi extremamente baixo devido à perda de endósporos agregados durante a moagem e o peneiramento. Além disso, a suspensão fica muito suja, dificultando sua contagem. Vários autores ([Chen et al., 1996](#); e [Souza & Campos, 1998](#)) tentaram melhorar esse método. Como podem ocorrer variações nos diferentes estádios de multiplicação desse hiperparasita, é importante quantificar o potencial de multiplicação do material produzido, isto é, o número de endósporos por grama de raízes moídas a fim de se determinar as dosagens necessárias para controle de nematóides em casa de vegetação ou no campo.

Esse método é útil para a avaliação do efeito do *P. penetrans* no manejo de nematóide-de-galhas (*Meloidogyne* spp.) no campo.

¹ Eng. Agrôn., D.Sc., Embrapa Cerrados, sharma@cpac.embrapa.br

² Eng. Agrôn., Ph.D., Queensland Department of Primary Industries, Plant Pathology Branch, Meiers Road, Indooroopilly, Queensland, 4068, Australia.

Metodologia

Informações são, portanto, descritas sobre os métodos melhorados de extração e quantificação de endósporos da bactéria *P. penetrans* nas raízes de tomateiro secadas e moídas em relação ao método proposto por [Stirling & Wachtel \(1980\)](#) que indicam maior rapidez, precisão e economicidade.

Para extrair e quantificar endósporos da bactéria, plântulas de tomateiro (cv. Flordade ou Tiny Tim) foram transplantadas em areia pasteurizada, em vasos com 15 cm diâmetro. Depois de duas ou três semanas de crescimento das plântulas, os juvenis de segundo estágio (J2) do nematóide-de-galhas *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood foram adicionados a uma suspensão de endósporos da bactéria *Pasteuria penetrans*. Quando a maioria dos J2 apresentaram de 5 a 20 endósporos da bactéria aderidos nas suas cutículas, 5000 J2 foram inoculados, em cada vaso, com o tomateiro. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura de 20 °C a 30 °C, e as raízes foram colhidas depois de as plantas terem acumulado, no mínimo, 900^o dias de temperatura ([Stirling, 1981](#)).

No método melhorado, as raízes foram secadas ao ar e moídas em pó fino (tamanho de partícula 15 µm) com a utilização de um moinho (Rocklab 1B Ring Mill de Sietronics, Austrália). Amostras de 100 mg das raízes moídas foram maceradas por meio de três métodos diferentes: método 1 - a amostra foi umedecida por três horas em 2 mL de solução de Clariphase® 4% (produto comercial de enzima pectolítica). Esse material foi

macerado manualmente com um pistilo por cinco minutos em cadinho de porcelana e diluído com água destilada até o volume de 50 mL; método 2 - método 1 mais quatro gotas de detergente Tween 20 na hora de umedecer; e, método 3 - método 1 mais quatro gotas de azeite de oliva. Esses três métodos foram comparados com o método descrito por [Stirling & Wachtel \(1980\)](#). Em cada método, foram feitas cinco repetições, e os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste de Duncan.

Resultados e Discussão

Os três métodos propostos extraíram mais endósporos do que no método padrão de Stirling & Wachtel, e a porcentagem de aumento na recuperação de endósporos foi de 247,7%, 229,2% e 176,9% para os métodos 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 1). O número de endósporos/g de pó de raízes secas, detectado (Tabela 1) pelos três métodos propostos, foram maiores do que os obtidos por outros autores ([Chen et al., 1996](#); e [Souza & Campos, 1998](#)). Dos três métodos testados, o 1, provou ser o mais eficiente e útil pelas seguintes razões: (a) a recuperação de maior número de endósporos por grama de material; (b) pode ser usada uma amostra pequena (100 mg) resultando na economia de 90% do material; (c) a suspensão final de endósporos é mais limpa e sendo assim permite uma contagem mais rápida; (d) não há agregação de endósporos por causa do tamanho de partículas pequenas e (e) não há perda durante o peneiramento devido ao uso da solução de Clariphase® 4% que amacia as partículas de raízes e ajuda na rápida dispersão de endósporos.

Tabela 1. Comparação entre diferentes métodos de extração e de quantificação de endósporos da bactéria, *Pasteuria penetrans*.

Método	Número de endósporos da <i>P. penetrans</i> /g de pó de raízes de tomateiro x 10 ⁸	Aumento relativo (%)
Método 1 (Clarifase only)	1,130 a *	247,7
Método 2 (Clarifase + 4 drops of Tween 20)	1,077 a	229,2
Método 3 (Clarifase + 4 drops of Olive oil)	0,900 b	176,9
Método Stirling & Wachtel (1980) (Testemunha)	0,325 c	100
C.v. (%)	8,00	

* Médias de repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($P \leq 0,01$), de acordo com o teste de Duncan.

Conclusão

- Entre os três métodos desenvolvidos, o 1 (100 mg de pó de raízes mais 2 mL de solução de Clariphase® 4%, enzima pectolítica) é o mais recomendável uma vez que foi mais eficiente e forneceu cerca de 247,7% a mais de endósporos/g de raízes moídas em relação [Stirling & Wachtel \(1980\)](#).

Referências Bibliográficas

BIRD, A. F.; BRISBANE, P. G. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie*, Paris, v. 11, p. 75-81, 1988.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D. W.; HEWLETT, T. E. Quantification of endospore concentrations of *Pasteuria penetrans* in tomato root material. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 28, n. 1, p. 50-55, 1996.

MINTON, N. A.; SAYRE, R. M. Suppressive influence of *Pasteuria penetrans* in Georgia soils on reproduction of *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 21, p. 574, 1989.

SHARMA, R. D.; STIRLING, G. R. *In vivo* mass production systems for *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v. 37, n. 4, p. 483-484, 1991.

SOUZA, J. T. de; Campos, V. P. Quantificação de *Pasteuria penetrans* em solo e raízes. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 22, n. 1, p. 22-31, 1998.

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

STIRLING, G. R.; WACHTEL, M. F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 26, p. 308-312, 1980.

Methods of Extraction and Quantification of *Pasteuria Penetrans* Endospores in Powdered Tomato Root Material

Abstract - Tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots that had been infected with *Meloidogyne javanica* parasitized by *Pasteuria penetrans* were air-dried and ground into a fine powder (15 µm particle size) with a hammermill and assayed for *P. penetrans* endospores in the following methods: 1) A 100 mg sample of powdered root material was soaked for 3 hr in 2 mL of a 4% Clariphase® solution (Pfizer Chemicals Ltd.), a commercial preparation of pectolytic enzymes. The macerate was then ground for 5 minutes with a mortar and pestle, diluted to 50 mL with distilled water and endospores were counted with a haemocytometer. 2) method 1 plus 4 drops of the detergent Tween 20 and 3) method 1 plus 4 drops of olive oil at the time of soaking. All the three methods were more efficient and resulted in a higher percentage of endospores recovery over the earlier method was 247,7%, 229.2% and 176.9%, respectively for methods described above.

Index terms: nematode, *Meloidogyne javanica*, endospores, qualitative extraction, quantification.

Comunicado Técnico, 86

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Cerrados
Endereço: BR 020 Km 18 Rod. Brasília/Fortaleza
Caixa postal: 08223 CEP 73301-970
Fone: (61) 388-9898
Fax: (61) 388-9879
E-mail: sac@cpac.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2002): 100 exemplares

Expediente

Supervisão editorial: Nilda Maria da Cunha Sette.
Revisão de texto: Maria Helena Gonçalves Teixeira.
Jaime Arbués Carneiro.
Editoração eletrônica: Leila Sandra Gomes Alencar.
Impressão e acabamento: Divino Batista de Souza
Jaime Arbués Carneiro.