

CESAR BAUER GOMES

**INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES NA MULTIPLICAÇÃO
DE *Pasteuria penetrans* “IN VIVO”**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

CESAR BAUER GOMES

**INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES NA MULTIPLICAÇÃO
DE *Pasteuria penetrans* “IN VIVO”**

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

APROVADA: 9 de outubro de 2001.

Prof. Silamar Ferraz
(Conselheiro)

Prof. Robert Weingart Barreto

Profª. Maria Catarina M. Kasuya

Prof. Onkar Dev Dhingra

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

A Deus, por tudo.

Aos meus pais Acácio e Norma.

À minha irmã Sizi.

Aos meus sobrinhos Natália e Eduardo.

A todos que amo.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela realização do curso de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida.

À Embrapa Clima Temperado, pela oportunidade de continuação do doutoramento após a minha contratação por esta empresa.

Ao professor Leandro G. Freitas, pela amizade, pela convivência, pelo apoio e pela orientação.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões, que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

À colega e Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado Vera Osório, pela colaboração e pelo incansável apoio nas análises estatísticas.

Aos estagiários do Laboratório de Nematologia/Bioagro, Carolina, Nilson, Clarisse e Lívia, pela valiosa colaboração na condução deste trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório, Édson, Regina, Jorge, José Mauro, Cléia, Antônio, Adriana, Vânia, Vinícius, Brener, Cláudia, Rosângela e Marcelo, pelo convívio harmônico.

Aos amigos e colegas de curso, Ronaldo, Ângelo, Alberto, Neuzinha, Alfredo, Wellington, Luciano, Simone, Wilson, Ricardo, Dalza, Flávio, Adelica, Cláudia Vanetti, Maria Célia, Ailton, Raquel e Adriana, pelo companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, Gelson, Daniel, Maria, Fernando e Claudiomar, à bibliotecária Regina e às colegas Mery Couto, Olinda Martins, Walkyria Bueno e Eva Choer, pela convivência, amizade e pelo apoio na conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
INFLUÊNCIA DO TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA NO SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO DE ENDÓSPOROS DE <i>Pasteuria penetrans</i> EM RAÍZES DE TOMATEIRO	10
Resumo	10
Summary.....	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
BIBLIOGRAFIA	21
PRODUÇÃO DE <i>Pasteuria penetrans</i> ‘IN VIVO’ EM SOLOS DE DIFERENTES TEXTURAS.....	24
Resumo	24
Summary.....	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
Produção massal de <i>P. penetrans</i> em solos de diferentes texturas.....	28

Adesão de endósporos de <i>P. penetrans</i> a J2 de <i>M. javanica</i> em solos de diferentes texturas.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
Produção massal de <i>P. penetrans</i> em solos de diferentes texturas.....	31
Adesão de endósporos de <i>P. penetrans</i> a J2 de <i>M. javanica</i> em solos de diferentes texturas.....	33
BIBLIOGRAFIA	37
EFEITO DO NÚMERO DE ENDÓSPOROS DE <i>Pasteuria penetrans</i> E DO MÉTODO DE PROMOÇÃO DA ADESÃO SOBRE A PENETRAÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE JAVANICA</i> E PRODUÇÃO DA BACTÉRIA EM TOMATEIRO	42
RESUMO	42
SUMMARY	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	47
Ensaio 1. Penetração de juvenis de <i>M. javanica</i> com diferentes números de endósporos de <i>P. penetrans</i> em sua cutícula, em raízes de tomateiro	47
Ensaio 2. Comparação de diferentes métodos de adesão de endósporos de <i>P. penetrans</i> a juvenis de <i>M. javanica</i>	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
Ensaio 1. Penetração de juvenis de <i>M. javanica</i> , com diferentes números de endósporos de <i>P. penetrans</i> aderidos, em raízes de tomateiro.....	51
Ensaio 2. Comparação de diferentes métodos de adesão de endósporos de <i>P. penetrans</i> a juvenis de <i>M. javanica</i>	54
BIBLIOGRAFIA	59
CONCLUSÕES GERAIS	65

RESUMO

GOMES, Cesar Bauer, D.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2001.
Influência de alguns fatores na multiplicação de *Pasteuria penetrans* “in vivo”. Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Conselheiros: Silamar Ferraz, Rosângela D’Arc de Lima Oliveira e César Antônio Sperândio.

Aspectos da multiplicação ‘in vivo’ de *Pasteuria penetrans* foram estudados em condições de laboratório e casa de vegetação, utilizando-se uma população de *Meloidogyne javanica* parasitando tomateiro. Foram investigados os efeitos da matéria orgânica e da textura do solo sobre a reprodução da bactéria, sendo também realizado um estudo sobre alguns métodos utilizados no processo de produção massal, com o objetivo de otimizar a produção do antagonista. Por meio do estudo da adição do resíduo orgânico ao substrato, verificou-se que a incorporação de esterco de curral melhorou o desenvolvimento das plantas, resultando em maior peso de raiz seca; entretanto, o número de endósporos produzidos/fêmea e o número de endósporos/g de raiz foram menores quando comparados aos de plantas crescidas nos substratos sem adição do resíduo. O número de endósporos produzidos/planta foi equivalente em substratos com ou sem esterco. Embora não tenha sido detectada interação entre a concentração de inóculo do nematóide e o tipo de substrato para número de endósporos produzidos por planta, verificou-se que a inoculação de 2.000 J2/planta resultou

em maior número de endósporos produzidos do que a inoculação com 1.000 J2/planta, independentemente do substrato utilizado. A produção de endósporos de *P. penetrans* em J2 de *M. javanica* parasitando tomateiro foi testada em solos com diferentes texturas e em areia. Observou-se maior número de endósporos da bactéria produzidos por planta nos solos com textura mais arenosa. Através de testes de adesão, 70 dias após a inoculação das plantas, pôde-se verificar maior número de endósporos da bactéria aderidos aos J2 de *M. javanica* nas amostras provenientes da camada superficial daqueles solos de textura mais leve do que os de textura mais pesada ou em areia pura. Por meio de um bioteste, observou-se que a maioria dos endósporos de *P. penetrans* foi carregada para o fundo dos vasos com areia, mas não em solos argilosos ou arenosos. Em um ensaio onde foi investigado o efeito de *P. penetrans* sobre a penetração de *M. javanica* em raízes de tomateiro, inocularam-se 1.000 J2 aderidos com 0, 10, 30, 60 ou 90 endósporos/J2/planta. Verificou-se que a média de 10 endósporos/J2 reduziu a penetração do nematóide nas raízes em 50%, quando comparados com J2 livres de bactérias, e que o aumento do número de endósporos aderidos aos J2 reduziu drasticamente a taxa de penetração. Para avaliar o efeito de variações da adesão da bactéria no J2, entre os J2 do inóculo, sobre a reprodução da bactéria, plantas de tomate mantidas em casa de vegetação foram inoculadas com 1.000 J2 de *M. javanica* contendo uma média de 10 endósporos/J2 aderidos pelo método de borbulhamento, centrifugação ou agitação. Observou-se grande variação do número de endósporos aderidos/J2 e maiores números de galhas e ovos/planta usando-se o método de borbulhamento. Apesar de o método de agitação ter proporcionado maior uniformidade na adesão, obteve-se menor número de endósporos produzidos por planta, comparado àquele obtido por centrifugação e borbulhamento ($P < 0,01$).

ABSTRACT

GOMES, Cesar Bauer, D.S., Universidade Federal de Viçosa, October 2001.
Influence of some factors on the *Pasteuria penetrans* mass production “in vivo”. Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Committee members: Silamar Ferraz, Rosângela D’Arc de Lima Oliveira and César Antônio Sperândio.

Some factors affecting *Pasteuria penetrans* multiplication ‘in vivo’ were studied in laboratory and in greenhouse using a population of *Meloidogyne javanica* parasitizing tomato plants. The effects of organic amendment and soil texture on the bacterial reproduction as well as some techniques for the mass production of *P. penetrans* were evaluated. Cattle manure improved plant development, resulting in higher dry root weight, however, the number of endospore per female of *M. javanica* and the endospore/g dry root were lower than in the plants growing in the non-amended substrate. The endospore production per plant was similar in the amended and non-amended substrates. Although there was no interaction between inoculum level and organic matter content on bacterial production, the inoculation of 2000 J2/plant resulted in higher endospore production, independently of the substrate, than inoculation of 1000 J2/plant. The *P. penetrans* endospore production in juveniles of *M. javanica* parasitizing tomato plants was evaluated in soils with different textures and in the river sand. Higher endospore numbers/plant were produced in sandy soils.

Bioassays done seventy days after plant inoculation resulted in higher *P. penetrans* endospore attachment in samples from the upper layer of lighter than heavier texture soils or in the river sand. When the attachment was studied in soils from the bottom of the pots, many endospores were detected in the river sand but not in the sandy or clay soils. The effect of *P. penetrans* on the penetration of *M. javanica* J2 in tomato roots was studied inoculating 1000 J2 without endospores or with an average of 10, 30, 60 or 90 endospores attached per J2. The average of 10 endospores/J2 decreased the nematode penetration by 50% compared to penetration of bacterium-free J2, and the increase of endospore attached to J2 decreased exponentially the penetration. The coefficient of variation (CV) of attachment among J2 was studied for the methods of air bubbling, centrifugation or shaking, and for the use of these nematodes as inoculum for the bacteria reproduction. The highest CV occurred using the air bubbling method. Even though the shaking method gave better uniformity in the attachment, the number of endospores produced was lower than that obtained in the centrifugation and in the air bubbling methods ($P < 0,01$).

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematóides fitoparasitas reduzem a produtividade em diferentes espécies cultivadas nas mais variadas regiões do planeta, sendo as perdas causadas por esses patógenos estimadas em 100 bilhões de dólares por ano em todas as culturas (SASSER e FRECKMAN, 1987). Espécies do gênero *Meloidogyne* são, dentre todos os fitonematóides, as maiores responsáveis por perdas na agricultura (DE GUIRAN e NETSCHER, 1970). Isso se deve à sua ampla distribuição geográfica, à polifagia e às diferenças biológicas de parasitismo entre populações da mesma espécie (CARNEIRO, 1992), o que dificulta a obtenção de cultivares resistentes e o uso de rotação de culturas, medidas estas mais efetivas e viáveis em nossas condições. Os nematicidas, em geral, não apresentam controle efetivo, sendo bastante caros e altamente tóxicos ao homem, aos animais e ao meio ambiente. Além disso, os mais efetivos nematicidas já foram retirados do mercado, devido à sua detecção em níveis inaceitáveis nas águas de lençóis freáticos (HAGUE e GOWEN, 1987).

O manejo racional é a única forma viável de reduzir as populações do parasita a níveis inferiores àqueles capazes de causar prejuízos, sem riscos de contaminação do meio ambiente. Através do controle biológico há uma possibilidade de se resgatar o equilíbrio populacional de nematóides no ecossistema natural, em inteira consonância com os demais organismos e

usuários do ecossistema agrícola (CAMPOS, 1992). Dentre os organismos assinalados como agentes de controle biológico de nematóides fitoparasitas, a bactéria *Pasteuria penetrans* Thorne (1940) Sayre & Starr (1985) é considerada um dos antagonistas mais importantes e promissores.

Pasteuria spp. são bactérias gram-positivas formadoras de micélio e endósporos, tradicionalmente classificadas como actinomicetos (SAYRE e STARR, 1989). Entretanto, estudos filogenéticos recentes sobre esse gênero refutam a posição taxonômica anterior, aproximando estes organismos dos membros das eubactérias gram-positivas: *Clostridium-Bacillus-Streptococcus* (ATIBALENTJA et al., 2000). *Pasteuria penetrans* caracteriza-se por ser parasita obrigatório de nematóides do gênero *Meloidogyne* (OOSTENDORP et al., 1990). Vários campos onde os nematóides das galhas limitavam a produção agrícola agora encontram-se supressivos a estes organismos, devido à presença desta bactéria (MANKAU, 1980; STIRLING, 1984; CIANCIO et al., 1992; CHEN et al., 1996; FREITAS et al., 2000a).

Pasteuria penetrans atua no controle de *Meloidogyne* spp., impossibilitando a fêmea de produzir ovos (SAYRE e WERGIN, 1977), ou mesmo impedindo o juvenil de penetrar nas raízes (STIRLING, 1984; BROWN et al., 1985). Além do mais, essa bactéria apresenta vários atributos favoráveis à sua utilização, como: especificidade ao hospedeiro; resistência dos endósporos ao calor e à dessecação; inocuidade a homem, animais e meio ambiente; viabilidade dos endósporos por longos períodos de armazenamento e uso compatível com solarização de solo; e aplicação de nematicidas e fungicidas (CAMPOS, 1992; HATS e DICKSON, 1992; MELKI et al., 1998; FREITAS et al., 2000b).

Em razão de sua natureza biotrófica, o modo mais eficiente de produzir grandes quantidades dessa bactéria é através da inoculação de J2 de *Meloidogyne* spp. infestados com endósporos em uma planta hospedeira suscetível, em casa de vegetação, das quais obtém-se um pó de raiz fino contendo *P. penetrans* (STIRLING e WACHTEL, 1980), que pode ser utilizado como fonte de inóculo no biocontrole do nematóide das galhas. Várias tentativas de cultivo 'in vitro' de *Pasteuria* spp. já foram realizadas, porém pouco sucesso tem sido alcançado.

VERDEJO e JAFFEE (1988) cultivaram *P. penetrans* parasitando *M. javanica* em raízes de tomateiro e batateira transformadas por *Agrobacterium rizogenes*, mas apenas uma geração de endósporos foi produzida. WILLIAMS et al. (1989) tentaram cultivar a bactéria em meios de cultura utilizados para microrganismos fastidiosos, entretanto nenhum crescimento foi observado. BISHOP e ELLAR (1991) também tentaram multiplicar *P. penetrans* em meios de cultura complexos. Embora os autores tenham observado a sobrevivência da bactéria por um período de até um mês, as estruturas formadas não ultrapassaram a fase inicial de desenvolvimento e morreram. REISE et al. (1991) cultivaram um isolado de *P. nishizawae* em meio de cultura constituído de 111 ingredientes por oito meses e observaram todas as fases do ciclo de vida da bactéria, porém o seu desenvolvimento não ultrapassou a sexta transferência. O uso da hidroponia para produção de *P. penetrans* já foi mencionado como uma possível alternativa (SERRACIN et al., 1994), entretanto ainda não se dispõe de dados experimentais empregando-se esta técnica. Dessa forma, a produção de *P. penetrans* ‘in vivo’ tem sido o único meio de aumentar sua população.

Dentre as pesquisas já realizadas para otimização da produção de *P. penetrans* ‘in vivo’, aspectos como densidade de inóculo do nematóide e da bactéria, concentração de endósporos, planta hospedeira para o nematóide, período de colheita, regime de irrigação e temperatura (STIRLING et al., 1990; SHARMA e STIRLING, 1991; DAVIES et al., 1991; HATZ e DICKSON, 1992; CIANCIO e BOURIJATE, 1995; CHEN e DICKSON, 1997; FREITAS et al., 1997; GIANNAKOU et al., 1997) foram relacionados como principais causas que afetam o número de endósporos produzidos. No entanto, outros aspectos, como número de endósporos aderidos ao nematóide (SEKHAR e GILL, 1990; STIRLING et al., 1990; DAVIES et al., 1991), técnica de inoculação (CHO et al., 1997), método de adesão da bactéria ao nematóide (GOMES et al., 1999), adição de resíduo orgânico ao substrato (GOMES et al., 1998) e textura do solo (MATEILLE et al., 1995), precisam ser considerados e melhor estudados.

Portanto, objetivou-se neste trabalho o estudo de fatores ou técnicas que permitissem a otimização da produção da bactéria 'in vivo', visando o uso de *P. penetrans* como produto biológico na prática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATIBALENTJA, N., NOEL, G.R., DOMIER, L.L. Phylogenetic position of the north american isolate *Pasteuria* that parasitizes the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, as inferred from 16S rDNA sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **50**:605-613. 2000.
- BISHOP, A.H., ELLAR, D.J. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* 'in vitro'. **Biocontrol Science and Technology**, **1**:101-114, 1991. 1991.
- BROWN, S.M., KEPNER, J.L., SMART, G.C. Increased crop yield following application of *Bacillus penetrans* to field plot infested with *Meloidogyne incognita*. **Soil Biology and Biochemistry**, **17**: 483-486. 1985.
- CAMPOS, V.P. Perspectivas do controle biológico de nematóides. **Revista Informe Agropecuário**, **16**: 26-30. 1992.
- CARNEIRO, R.M.D.G. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **27**:113-121. 1992.
- CHEN, Z.X., DICKSON, D.W., MCSORLEY, R., MITCHELL, D.J., HEWLETT, T.E. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, **28**:159-168. 1996.
- CHEN, Z.X., DICKSON, D.W. Effect of ammonium nitrate and time of harvest on mass production of *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, **27**: 153-60. 1997.

- CHO, M.R., DICKSON, D.W., HEWLETT, T.E. Comparison of inoculum methods, *Meloidogyne* spp. and different host plants for production of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, **29**(4):573-574. 1997.
- CIANCIO, A., MANKAU, R., MUNDO-OCAMPO, M. Parasitism of *Helicotylenchus lobus* by *Pasteuria penetrans* in naturally infested soil. **Journal of Nematology**, **24**(1): 29-35. 1992.
- CIANCIO, A., BOURIJATE, M. Relationship between *Pasteuria penetrans* infection levels and density of *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Mediterranea**, **23**: 43-49. 1995.
- DAVIES, K.G., LAIRD, V., KERRY, B.R. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, **14**(4): 611-618. 1991.
- DE GUIRAN, G., NETSCHER, C. Les nématodes du genre *Meloidogyne*, parasites de cultures tropicales. **Cah. ORSTON. Ser. Biol.**, **11**:151-185. 1970.
- FREITAS, L.G., MITCHELL, D.J., DICKSON, D.W. Temperature effects on attachment of *P. penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1 on tomato. **Journal of Nematology**, **29**: 547-55. 1997.
- FREITAS, L.G., NEVES, W.S., CARMO, D.N., SILVA, G.S. First case reported in Brazil of inducing soil suppressiveness to root-knot nematode by *P. penetrans* on large areas in the field. **Nematologia Brasileira**, **24**(1):116. 2000a.
- FREITAS, L.G., MITCHEL, D.J., DICKSON, D.W., CHELLEMI, D.O. Soil solarization and organic amendment effects on *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, **24**(2):133-146. 2000b.
- GIANNAKOU, I.O, PEMBROKE, B., GOWEN, S.R., DAVIES, K.G. Effects of long-term storage and above-normal temperature on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, **43**: 185-192. 1997.
- GOMES, C.B., FREITAS, L.G., NETO, A.R. Efeito da matéria orgânica sobre a produção de endósporos de *Pasteuria penetrans* em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, **23**:305. 1998. (Resumo).
- GOMES, C.B., FREITAS, L.G., ALMEIDA, A.M.S.A. Comparação de métodos para adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, **24**:345. 1999. (Resumo).

- HAGUE, N.G.M., GOWEN, S.R. Chemical control of nematodes. In.: Brown, R.H., KERRY, B.R. (eds). **Principles and practice of nematode control in crops**. London, Academic Press, 1987. p.131-173.
- HATZ, B., DICKSON, D.W. Effect of temperature on attachment development and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, **24**: 512-521. 1992.
- MANKAU, R. Biological control of *Meloidogyne* populations by *Bacillus penetrans* in West Africa. **Journal of Nematology**, **12**:230. 1980.
- MATEILLE T., DUPONNIS, R., DIOP, M.T. Influence des facteurs telluriques abiotiques et de la plante hôte sur l'infection des nematode phytoparasites du genre *Meloidogyne* par l'actinomicète parasitoïde *Pasteuria penetrans*. **Agronomie**, **15**: 581-591. 1995.
- MELKI, K.C., GIANNAKOU, I.O., PEMBROKE, B., GOWEN, R. The cumulative build-up of *Pasteuria penetrans* in root-knot nematode infested soil and the effect of soil applied fungicides on its infectivity. **Fundamental Applied Nematology**, **21**(6): 679-683. 1998.
- OOSTENDORP, M., DICKSON, D.W., MITCHEL, D.J., Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southern United States. **Journal of Nematology**, **22**: 525-531. 1990.
- REISE, R.W., HACKETT, K.T., HUETELL, R.N. Limited cultivation of *Pasteuria nishizawe*. **Journal of Nematology**, **23**(4):547-548. 1991. (Abstract).
- SASSER, J.N., FRECKMAN, D.W. A word perspective on Nematology: the role of the Society. In: VEECH, J.A., DICKSON, D.W. (eds.) **Vistas on Nematology: a comemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists**. Hyattsville, Maryland: Society of Nematologists, 1987. p.7-14.
- SAYRE, R.M., STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**. 52:149-165. 1985.

- SAYRE, R.M., STARR, M.P. Genus *Pasteuria* Metchnikoff 1988, 188, 166^{AL} emend. Sayre; Starr, 1985, 149, Starr & Sayre 1988^a, 27 (Nom. Cons. Opin. 61 Jud. Comm. 1986, 119. Not *Pasteuria* in the sense of Henrici and Jhonson (1935), Hirsch (1972), or Staley (1973); see Starr *et al.* (1983) and Judicial Commission (1986). In: WILLIAM, S.T., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. (eds.) **Berguey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. Vol.4. 1989. p.2601-2615.
- SAYRE, R.M., WERGIN, W.P. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, **129**(2): 1091-1101. 1977.
- SEKHAR, N.S., GILL, J.S. Penetration and multiplication of *Meloidogyne incognita* as influenced by *Pasteuria penetrans*. **Indian Journal of Nematology**, **20**(2): 213-218. 1990.
- SERRACIN, M.A, SCHERGER, A.C., DICKSON, D.W., WEINGARTNER, D.P., HEWLLET, T. An alternative method for culturing *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, **22**: 565. 1994.
- SHARMA, R.D., STIRLING, G.R. In vivo mass production systems for *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, **37**: 483-484. 1991.
- STIRLING, G.R., WATCHEL, M.G. Mass production of *Pasteuria penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. **Nematologia**, **26**: 308-312. 1980.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, **74**(1): 55-69. 1984.
- STIRLING, G.R., SHARMA, R.D., PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. **Nematologica**, **36**:246-252. 1990.
- THORNE, G. *Dubosqia penetrans* n. sp. (Sporozoa: Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**. **7**:51-53. 1940.
- VERDEJO, S., JAFFE, B.A. Reproduction of *Pasteuria penetrans* in a tissue culture system containing *Meloidogyne javanica* and *Agrobacterium rizhogenes*-transformed roots. **Phytopathology**, **8**: 1284-1286. 1988.

WILLIAMS, A.B., STIRLING, G.R., HAYWARD, A., PERRY, J. 1989.
Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of
root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). **Journal of Applied
Bacteriology**, 67(2):145-156.

INFLUÊNCIA DO TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA NO SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO DE ENDÓSPOROS DE *Pasteuria penetrans* EM RAÍZES DE TOMATEIRO

Resumo - Influência do Teor de Matéria Orgânica no Substrato sobre a Produção de Endósporos de *Pasteuria penetrans* em Raízes de Tomateiro. **Nematologia Brasileira.**

Foram comparados substratos com diferentes teores de matéria orgânica para a reprodução da bactéria *Pasteuria penetrans* em casa de vegetação. Mudanças de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) do grupo Santa Cruz, cultivadas em substrato composto de solo, areia e esterco de curral nas proporções de 1:1:0, 2:2:1 e 1:1:1 (v:v:v), foram inoculadas com 1.000 ou 2.000 J2 de *Meloidogyne javanica*, com média de nove endósporos aderidos por J2. Setenta dias após a inoculação, os sistemas radiculares foram separados da parte aérea e lavados, para avaliação. Verificou-se que a inoculação de 2.000 J2 por planta resultou em maior número de endósporos produzidos, independentemente do substrato utilizado. As plantas produzidas no substrato sem adição de esterco apresentaram menores pesos da matéria fresca e seca de raízes, maior índice de galhas, maior número de endósporos/fêmea e maior número de endósporos/g de raiz quando comparadas às plantas crescidas nos substratos enriquecidos com esterco de curral, porém não houve diferença no número total de endósporos produzidos por planta nos três tratamentos. A matéria orgânica exerceu efeito estimulante sobre as plantas, mas não aumentou a produção de endósporos de *P. penetrans*.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*, *Pasteuria penetrans*, produção massal, matéria orgânica, esterco de curral.

Summary - Effect of Organic Matter Content in the Substrate on *Pasteuria penetrans* Endospore Production in Tomato Plant Roots.
Nematologia Brasileira.

The effect of the cattle manure amendment of soil and sand mixtures at the rates of 1:1:1; 2:2:1 and 1:1:0 (v:v:v) of soil, sand and manure, respectively, on the reproduction of *Pasteuria penetrans* was studied in the greenhouse. Each tomato plant was inoculated with 1000 or 2000 *Meloidogyne javanica* J2 carrying an average of nine endospores each. Seventy days after the inoculation, the root system was separated from the shoot and washed for evaluation. Inoculations with 2000 J2/plant resulted in a higher endospore production, independent of the substrate. The plants growing in the substrates without organic amendment had lower dry and fresh root weight, and higher gall index, number of endospore per female and endospore number/g of root compared to plants growing in the other substrates. The organic amendment was stimulatory to the plants, which developed larger root systems without improving endospore production.

Key words: *Meloidogyne javanica*, *Pasteuria penetrans*, massal production, cattle manure, organic matter.

INTRODUÇÃO

Dentre os organismos antagonistas estudados no controle biológico de nematóides, a bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr destaca-se, por ser um agente de biocontrole eficiente e por ser bastante resistente às intempéries, persistindo no solo por vários anos (Campos, 1992). Devido à natureza biotrófica de *P. penetrans*, seu cultivo em meio de cultura ainda não é possível. Portanto, sua produção é feita “in vivo” através do cultivo do nematóide na planta hospedeira em casa de vegetação (Stirling & Wachtel, 1980), da qual se obtém um pó fino contendo endósporos da bactéria. Entretanto, esse processo é lento e as quantidades obtidas são suficientes, apenas, para a sua introdução em pequenas áreas. Dessa forma, a otimização de sua produção "in vivo" necessita ser incrementada.

O papel benéfico da matéria orgânica no desenvolvimento das plantas é bastante conhecido. A incorporação de um composto orgânico ao solo pode promover a melhoria de sua estrutura e fornecer nutrientes, estimulando o desenvolvimento das plantas (Miller *et al.*, 1968; Alam *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1983; Tarjan, 1977; González & Canto-Sáenz, 1993). Vários trabalhos tratam também do efeito dos compostos orgânicos sobre nematóides fitoparasitas, principalmente do gênero *Meloidogyne*. Os efeitos observados sobre tais patógenos variam com o tipo, a quantidade e o processo de decomposição do material orgânico (Mian & Rodriguez-Kábana, 1982; Weltzien, 1989; Brzeski, 1991; Zambolim *et al.*, 1996). No entanto, alguns desses materiais, uma vez adicionados ao solo, podem levar ao desenvolvimento de um sistema radicular mais denso, aumentando, assim, a superfície específica da raiz a ser penetrada pelo nematóide e, conseqüentemente, promovendo maior número de sítios infectados (Kumar & Nair, 1976; Zambolim *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 1997). Como *P. penetrans* alimenta-se do fluido pseudocelômico da fêmea de *Meloidogyne* spp., tem-se a hipótese de que a planta hospedeira mais bem nutrida proporcionará melhor desenvolvimento do nematóide, que, por conseguinte, resultará em maior multiplicação da bactéria.

Com o intuito de estudar o efeito da matéria orgânica sobre a multiplicação de *P. penetrans*, realizou-se um ensaio em casa de vegetação para avaliar a influência da adição de esterco de curral curtido em substratos compostos de solo e areia, em diferentes proporções, sobre a produção de endósporos da bactéria em *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (Netcher & Sikora) parasitando tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados os substratos com as proporções de solo, areia, e esterco, respectivamente, de 1:1:0; 1:1:1 e 2:2:1 (v:v:v). O solo, a areia e o esterco foram previamente tratados com brometo de metila na dosagem de 100 mL/m³. As análises físicas e químicas dos diferentes substratos (Tabela 1) foram realizadas no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (Anônimo, 1997), sendo as adubações e correções realizadas de acordo com os resultados de análise de solo e seguindo as recomendações para a cultura do tomate (Takahashi, 1993). Esse ensaio compreendeu seis tratamentos com sete repetições, disposto em esquema fatorial 3 x 2, sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado.

Tabela 1 - Resultado das análises granulométrica e química dos substratos compostos por solo, areia e matéria orgânica nas proporções: 1:1:0, 2:2:1 e 1:1:1

Substrato	M.O.	pH H ₂ O	P	K	Al	Ca	Mg	H + A	SB	CTC	areia	silte	argila
	--%	--1:2,5--	--mg/dm ⁻³ --		-----cmol/dm ⁻³ -----						-----%-----		
					---						--		
1:1:0	1,06	4,8	2,8	10	0,3	0,3	0,2	2,4	0,47	2,87	79	1	20
2:2:1	2,48	5,2	264,1	685	0,0	1,6	0,9	1,2	4,25	5,45	76	4	20
1:1:1	3,62	5,5	373,6	882	0,0	2,1	1,0	1,5	5,39	6,89	71	5	24

Uma população de *M. javanica*, mantida em tomateiro em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, foi utilizada como inóculo do nematóide. Juvenis de segundo estágio (J2) desse nematóide foram obtidos das raízes de tomateiro através da combinação do método de extração de ovos de Hussey & Barker (1973) e do funil de Baermann modificado (Pitcher & Flegg, 1968). Utilizou-se o isolado P25 de *P. penetrans* proveniente da Flórida, EUA, o qual foi mantido em *M. javanica* parasitando plantas de tomate do grupo Santa Cruz em casa de vegetação. Fêmeas do nematóide infectadas por *P. penetrans* foram retiradas das raízes, colocadas em um tubo de ensaio e maceradas, para obtenção de uma suspensão de endósporos.

Uma suspensão de juvenis de *M. javanica* de até seis dias de idade na concentração de $1,65 \times 10^5$ endósporos de *P. penetrans*/mL foi agitada sob borbulhamento de ar em 150 mL de água em um béquer por 3,5 horas à temperatura ambiente de aproximadamente 23°C. A adesão de *P. penetrans* à cutícula dos J2 foi verificada em 20 nematóides selecionados ao acaso sob microscópio óptico. A média do número de endósporos aderidos por J2 foi de 8,65.

Mudas de tomateiro com 20 dias de idade foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 2,0 L, contendo aproximadamente 1.700 g dos diferentes substratos. Quando as plantas atingiram aproximadamente 10 cm de altura, procedeu-se à sua inoculação com 1.000 ou 2.000 J2 de *M. javanica* com endósporos por planta.

Setenta dias após a inoculação, os sistemas radiculares foram separados da parte aérea das plantas, lavados, pesados (peso da matéria fresca - PMFR), avaliados quanto ao índice de galhas (IG), conforme a escala visual de zero a dez proposta por Barker *et al.* (1986), e armazenados em sacos plásticos a 6°C, para posterior determinação do número de endósporos/fêmea de *M. javanica* (NEF). O NEF foi verificado através da retirada, ao acaso, de dez fêmeas do nematóide de cada sistema radicular e posterior maceração em tubo plástico tipo ependorf,

contendo 1 mL de água esterilizada, sendo feitas as contagens em câmara de Neubauer, nas quais se dividiu o valor total por 10, para determinação do NEF.

Logo após, as raízes foram secas ao sol por uma semana em casa de vegetação em estufa a 39°C por 24h, pesadas (peso de raiz seca- PRS) e moídas, individualmente, para obtenção de um pó de raiz fino (Stirling & Watchel, 1980). O número de endósporos presente no pó foi determinado de acordo com metodologia descrita por Souza (1997). Os índices de galhas, PMFR e PRS e os valores transformados em \sqrt{x} das variáveis NEF, número de endósporos/g de raiz (NEGR) e número de endósporos/planta (NEPL) foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Substratos com esterco de curral (solo:areia:esterco) nas proporções de 1:1:1 e 2:2:1 resultaram em maiores pesos da matéria fresca e seca (PMFR/ PRS) das raízes de tomateiro; entretanto, observou-se menor número de endósporos/g de pó de raiz (NEGR) e índice de galhas (IG) nos substratos contendo matéria orgânica, comparativamente ao substrato composto unicamente por solo e areia (Tabelas 2 e 3). Observou-se interação entre os fatores substrato e concentração do nematóide apenas para a variável índice de galhas (Tabela 2). Verificou-se, também, que a inoculação de plantas com 2.000 J2 proporcionou maiores IG (Tabela 2), NEGR, número de endósporos/sistema radicular (NEPL) e número de endósporos/fêmeas do nematóide (NEF) em todos os substratos estudados. Por outro lado, o aumento da concentração de nematóides inoculados não influenciou o PMFR e PRS (Tabelas 2 e 3). Stirling & Watchel (1980) relatam que o número de fêmeas de *Meloidogyne* spp. parasitadas/sistema radicular pode ser aumentado inoculando-se mais de uma vez a planta hospedeira, ou então, segundo Kasumimoto *et al.* (1993), elevando-se o número de nematóides com a bactéria a

ser introduzida nas raízes da espécie vegetal. Segundo Sharma e Stirling (1991),

Tabela 2 - Efeito do substrato e da concentração de J2 de *M. javanica* contendo endósporos de *P. penetrans* sobre o índice de galhas de raízes de tomateiro inoculadas com o nematóide

SUBSTRATOS (solo: areia:matéria orgânica)	CONCENTRAÇÃO DE <i>M. javanica</i>	
	2.000 J2	1.000 J2
	Índice de galhas	
1:1:0	8,50 Aa	6,21 Ab
2:2:1	6,35 Ba	1,85 Bb
1:1:1	4,64 Ca	3,07 Bb
CV 21,14%		

*A,B,a,b - médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, em cada coluna, e das mesmas letras minúsculas, em cada linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 3 - Efeito de substratos com diferentes proporções de solo, areia e matéria orgânica (v:v:v) e da concentração do nematóide sobre o peso da matéria fresca da raiz (PMFR), peso de raiz seca (PRS), número de endósporos/fêmea (NEF), número de endósporos/g de raiz (NEGR) e número de endósporos/sistema radicular (NEPL) em plantas de tomateiro inoculadas com J2 de *M. javanica* contendo endósporos de *P. penetrans*

	PMFR(g)	PRS(g)	*NEF	*NEGR	*NEPL
SUBSTRATOS (solo:areia:M.O.**)					
1:1:0	16,54 b	2,17 b	1,90 x 10 ⁶ a	2,57 x 10 ⁸ a	5,48 x 10 ⁸ a
2:2:1	31,75 a	4,49 a	9,53 x 10 ⁵ b	1,38 x 10 ⁸ b	5,53 x 10 ⁸ a
1:1:1	27,67 a	3,63 a	3,79 x 10 ⁵ c	1,15 x 10 ⁸ b	4,03 x 10 ⁸ a
CONCENTRAÇÃO (<i>M. javanica</i> /planta)					
2.000 J2	26,17 a	3,51 a	1,53 x 10 ⁶ a	2,33 x 10 ⁸ a	7,14 x 10 ⁸ a
1.000 J2	23,21 a	3,18 a	4,82 x 10 ⁵ b	9,55 x 10 ⁷ b	2,83 x 10 ⁸ b
CV(%)	20,57	28,57	36,26	27,04	27,70

* Médias, nas colunas, seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Dados originais transformados em \sqrt{x} .

** M.O.- matéria orgânica.

há um limite máximo do número de nematóides adicionados suportável para o sistema radicular, não ocorrendo aumento do número de fêmeas infectadas ou aumento da concentração da bactéria/g de raiz quando são utilizados níveis de inóculo muito elevados. A determinação do nível máximo de inóculo não foi o objetivo deste trabalho, mas, como a adição da matéria orgânica resultou em melhor desenvolvimento dos sistemas radiculares (Figura 1), acredita-se que essas plantas suportariam maior carga de inóculo e, dessa forma, seria possível aumentar a produção de *P. penetrans* por planta, porém esse assunto é hipótese para estudos complementares futuros.

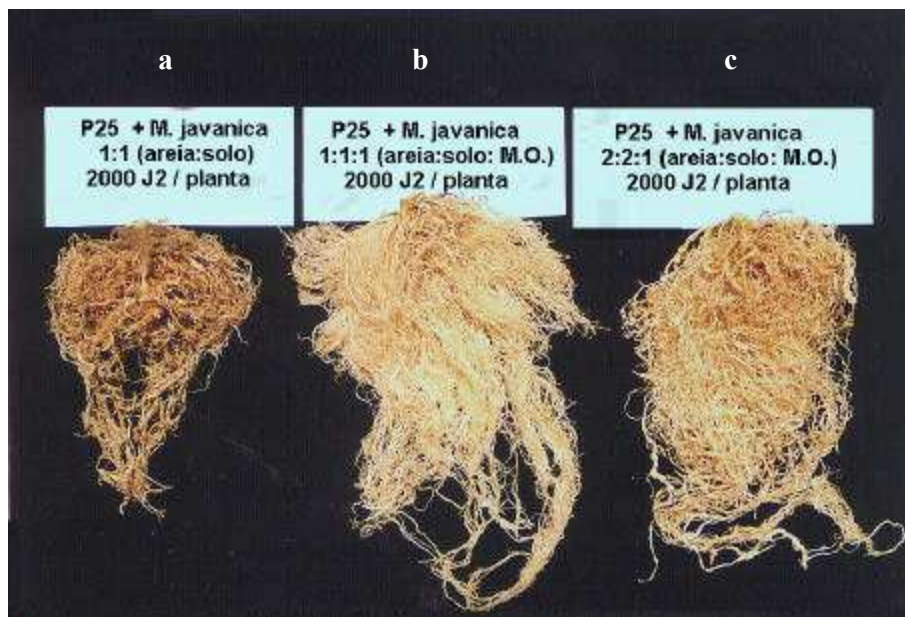


Figura 1 - Raízes de tomateiro crescidas em substratos compostos por solo, areia e esterco de curral nas proporções de 1:1:0 (a), 1:1:1 (b) e 2:2:1 (c), 70 dias após a inoculação de 2.000 J2 de *M. javanica* com *P. penetrans*.

Um melhor desenvolvimento de plantas devido à adição da matéria orgânica ao substrato é um fato bastante conhecido. No entanto, os efeitos da matéria orgânica sobre populações de nematóides do solo parecem ser influenciados pelo tipo, pela quantidade e pelo período de decomposição do material incorporado (Miller *et al.*, 1968; Tarjan, 1977; Alam *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1983; Weltzien, 1989; Brzeski, 1991; Gonzáles & Canto-Sáenz, 1993; Dias *et al.*, 2000).

Os menores índices de galhas foram obtidos em plantas produzidas nos substratos contendo esterco de curral. Nas plantas desenvolvidas em substrato com matéria orgânica e inoculadas com 2.000 J2, o IG diminuiu de aproximadamente 25% para cerca de 50% quando o volume de esterco utilizado passou da metade do volume do solo e da areia para igual proporção na mistura, comparativamente àqueles tomateiros desenvolvidos em substrato sem adição de matéria orgânica (Tabela 2). A adição do esterco também levou à redução do IG quando 1.000 J2 foram adicionados/planta, mas este índice não diferiu para os dois teores de matéria orgânica testados. Ribeiro *et al.* (1997), estudando o efeito do esterco de curral incorporado ao solo sobre a reprodução de *M. javanica* em tomateiro, verificaram maior número de galhas e massas de ovos com a incorporação do esterco e atribuíram esses resultados a um possível aumento do volume de raízes disponíveis aos nematóides. Embora os resultados obtidos no presente trabalho tenham diferido daqueles obtidos por Ribeiro *et al.* (1997), o maior IG obtido no substrato 1:1:0 pode ser atribuído ao menor desenvolvimento do sistema radicular, acarretando, dessa forma, aumento da relação galhas/raiz determinada pela escala visual de Barker *et al.* (1986), como pode ser observado na Figura 1.

O NEGR foi cerca de duas vezes maior no substrato 1:1:0, comparativamente aos demais tratamentos que receberam matéria orgânica (Tabela 3). Pode-se verificar que nos tratamentos em que os IG foram maiores, ocorreu também maior número de endósporos/g de pó de raiz (Tabela 2). Dessa forma, a adição de esterco de curral ao substrato com solo e areia reduziu o NEGR. Efeito semelhante foi observado para o NEF nas plantas cultivadas em

substrato acrescido de resíduo orgânico. Possivelmente, mecanismos de resistência de planta estimulados pela adição do esterco (Singh *et al.*, 1983) estejam envolvidos nesse processo, impedindo o desenvolvimento normal do nematóide, mas o maior desenvolvimento da raiz pode ter reduzido a proporção de galhas por raízes saudáveis, levando a um menor índice de galhas, que é uma avaliação visual subjetiva, isto é, um mesmo número de galhas pode representar IG diferentes em sistemas radiculares com mais ou menos raízes. O mesmo número de endósporos produzidos por planta em substratos sem esterco ou nos dois níveis de esterco sugere que o resíduo orgânico não reduziu a penetração do nematóide nas raízes. A ausência do esterco de curral resultou em menor volume de raízes a serem moídas e em maior concentração de endósporos/g de raiz, o que é desejável na produção de um produto comercial à base de pó de raiz com *P. penetrans*.

Verificou-se que o NEF foi maior nas plantas desenvolvidas em substrato constituído apenas por solo e areia e que o aumento da proporção do resíduo orgânico na mistura reduziu o número de endósporos produzidos por fêmeas de *M. javanica* (Tabela 3). Estes resultados corroboram as observações visuais do tamanho das fêmeas de *M. javanica* feitas no momento de sua retirada das raízes, para avaliação do NEF. Observou-se então que as fêmeas obtidas das plantas desenvolvidas nos substratos contendo esterco de curral eram menores. De acordo com alguns pesquisadores, a adição de resíduos orgânicos e, ou, fertilizantes ao solo pode ter efeito nematicida direto sobre os nematóides, levar à produção de substâncias tóxicas durante o processo de decomposição ou, ainda, aumentar a resistência da planta hospedeira à invasão e ao desenvolvimento destes patógenos no interior das raízes (Miller *et al.* 1968; Singh *et al.*, 1983; Stirling, 1991; Riispere, 1990; Chen & Dickson, 1997). Portanto, apesar de o nematóide ter penetrado nas raízes dos tomateiros cultivados em substratos contendo esterco de curral, algum mecanismo de resistência ou de tolerância da planta pode ter sido ativado, afetando o seu desenvolvimento normal, interferindo, assim, na produção de endósporos de *P. penetrans* no interior das fêmeas de *M. javanica*. A resistência adquirida pela planta em resposta à adição

de um resíduo ou composto orgânico é relatada na literatura para diferentes patógenos (Zambolim *et al.*, 1996).

Apesar de a adição do resíduo orgânico ter influenciado negativamente o número de endósporos produzidos por grama de raiz, não foi verificada diferença significativa ($P < 0,05$) para número de endósporos totais por sistema radicular (NEPL) entre os tratamentos, obtendo-se, portanto, uma média de 5×10^8 endósporos/sistema radicular. Isso se deve, provavelmente, ao uso de esterco curtido e esterilizado na mistura solo: areia. Dessa forma, o avançado estado de decomposição da fonte orgânica utilizada e a eliminação da microbiota natural do esterco, promovida pela sua prévia esterilização, podem ser responsáveis pelo pequeno efeito nematicida observado sobre os nematóides inoculados, afetando seu desenvolvimento tardiamente, conforme observações já discutidas sobre o efeito gradual da adição do esterco de curral no NEF para os diferentes substratos (Tabela 3). De acordo com Alam *et al.* (1980) e Singh *et al.* (1983), um corretivo orgânico pode aumentar a resistência da planta ao desenvolvimento do nematóide nas raízes. Portanto, devido à inexistência de diferenças para NEPL entre os tratamentos, parece estar ocorrendo, apenas, o retardo no crescimento do nematóide em função do aumento da resistência da planta induzido pelo esterco. A redução do tamanho das fêmeas e do NEGR pode ter sido compensada por ligeiro aumento da penetração de J2 com *P. penetrans* nas raízes das mudas desenvolvidas em substratos com esterco, pois as plantas, possivelmente, já apresentavam raízes mais fortes e com mais sítios de penetração. No entanto, esse efeito não pôde ser observado devido ao mascaramento causado pelo supercrescimento radicular em substratos onde se adicionou o resíduo orgânico.

Por meio desses resultados, observou-se que maiores níveis de matéria orgânica no solo resultam em raízes de tomateiro com maior volume e peso, porém não proporcionam o aumento do número de endósporos produzidos por planta, e que o número de J2 com endósporos inoculado por planta é também um fator importante na produção massal da bactéria.

BIBLIOGRAFIA

- ALAM, M.M.; A.M. KHAM & SAXENA, S.K. 1980. Mechanisms of control of plant parasitic nematodes as a result of application of organic amendment to the soil. IV Role of formaldehyde and acetone. *Indian Journal of Nematology*, 8(2): 172-174.
- ANÔNIMO. 1997. EMBRAPA-CNPS. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: 212p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos; 1).
- BARKER, R.R.; J.L. TOWNSHEND; G.W. BIRD; J.J. THOMASON & D.W. DICKSON. 1986. Determining nematode population responses to control agents. p. 283-296. In: K.D. HICKEY. *Methods for evaluating pesticides for plant control of plant pathogens*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- BRZESKI, M.W. 1991. Soil organic amendments effect on nematodes: Literature review. *Material XXXI Sesji Naukowej Instytutu Ochrony Roslin*. pp. 233-244.
- CAMPOS, V.P. Perspectivas do controle biológico de nematóides. 1992. *Revista Informe Agropecuário*, 16: 26-30.
- CHEN, Z.X. & D.W. DICKSON. 1997. Effect of ammonium nitrate and time of harvest on mass production of *Pasteuria penetrans*. *Nematropica*, 27(1): 53-60.
- CHO, M.R.; D.W. DICKSON & T.E. HEWLETT. 1997. Comparison of inoculum methods, *Meloidogyne* spp. and different host plants for production of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 29(4):573-574.
- DIAS, C.R.; EZEQUIEL, D.P.; SCHWAN, A.V. & S. FERRAZ. 2000. Efeito da adubação à base de esterco de galinha poedeira sobre a população de *Meloidogyne incognita* no solo. *Nematologia Brasileira*, 24(1): 59-63.
- GONZÁLEZ, A.; M. CANTO-SÁENZ. 1993. Comparación de cinco enmiendas orgánicas em el control de *Globodera pallida* em microparcels em Peru. *Nematropica*, 23:133-139.

- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- KASUMIMOTO, T.; R. IKEDA & H. KAWADA. 1993. Dose response of *Meloidogyne incognita* infecting cherry tomatoes application of *Pasteuria penetrans*. *Japanese Nematology*. 23: 10-18.
- KUMAR, T.P. & R.G.K. NAIR. 1976. Effect of some green leaves and organic wastes on root-knot infestation on bhind. *Agricultural Reserch Journal of Kerala*, 14: 64-67.
- MIAN, I.H. & R. RODRÍGUEZ-KÁBANA. 1982. Organic amendments with high tannin and phenolic contents for control *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica*, 12: 221-234.
- MILLER, P.M.; G.S. TAYLOR & S.E. WIRHEIN. 1968. Effects of the celulosic soil amendments and fertilizers on *Heterodera tabacum*. *Plant Disease Reporter*, 53(6): 441-445.
- PITCHER, R.S. & J.J.M. FLEGG. 1968. An improved final separation sieve for the extration of plant-parasitic nematodes form soil debris. *Nematologica*, 14: 123-127.
- RIBEIRO, R.C.F.; E.H., MIZOBUTSI; D.G., SILVA; J.C.R. PEREIRA & L., ZAMBOLIM. 1997. Controle de *Meloidogyne javanica* em alface por meio de compostos orgânicos. *Fitopatologia Brasileira*, 23(1): 42-44.
- RIISPERE, A. 1990. On the influence of the mineral nutrition of the host plant on the development of the potato cyst nematode. *Eesti Teaduste Akadeemia Toimetised Bioloogia*, 39: 196-204.
- SHARMA, R.D. & R. STIRLING. 1991. In vivo mass production systems for *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 37: 483-484.
- SINGH, S.P.; V. PANT; A. M. KHAM & S.K. SAXENA. 1983. Atracctiveness of *Meloidogyne inconita* larvae to the root of tomato and changes in biochemical content of plants as affected by oilcakes and nematicides. *Nematologia Mediterranea*, 11(2): 115-118.
- SOUZA, J.T. 1997. Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de lavras, 112p.
- STIRLING, G.R. & M.G. WATCHEL. 1980. Mass production of *Pasteuria penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologia*, 26: 308-312.

- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. CAB International. Oxon. UK:228p.
- TAKAHASHI, H.N. 1993. Nutrição e adubação de tomate estaquiado. In: FERREIRA, M.E.; P.D. CASTELANE & M.C.P.; CRUZ. Nutrição e adubação de hortaliças. Potafos, p.302-332.
- TARJAN, A.C. 1977. Use of municipal refuse compost on nematode-infected citrus. *Citrus and Vegetable Magazine*, 40(6): 44-49.
- ZAMBOLIM, L.; M.A. SANTOS; W.F. BECKER & G.M. CHAVES. 1996. Agro-waste soil amendments for the control of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Fitopatologia Brasileira* 21(2): 250-253.
- WELTZIEN, H.C. 1989. Some effects of composted organic materials on plant health. *Agricultural Ecosystem and Environment*, 27: 439-446.

PRODUÇÃO DE *Pasteuria penetrans* 'IN VIVO' EM SOLOS DE DIFERENTES TEXTURAS

Resumo - Produção de *Pasteuria penetrans* 'in vivo' em Solos de Diferentes Texturas. **Nematologia Brasileira**.

A produção e adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* em J2 de *Meloidogyne javanica* foram avaliadas em solos com diferentes texturas e características químicas e em areia de rio sob condições de casa de vegetação. Mudanças de tomateiro do grupo Santa Cruz foram transplantadas para vasos contendo os diferentes solos ou areia infestados nos 5 cm superficiais com *P. penetrans* na concentração de 1×10^5 endósporos/g de solo e inoculadas com 2.000 J2/planta. Decorridos 70 dias, as raízes das plantas foram colhidas, lavadas, secas ao sol, pesadas e moídas, para avaliação de peso de raiz seca, número de endósporos/g de pó de raiz e número de endósporos/planta. Amostras de 50 cm³ de solo foram retiradas da camada superficial (0-5 cm) e do fundo (17-20 cm) de cada vaso, secas ao sol e infestadas com 600 J2 de *M. javanica*, para averiguar a percolação dos endósporos, observando-se o número de endósporos aderidos por J2 e a percentagem de J2 aderidos por *P. penetrans* ao final do período observado. Verificou-se maior número de endósporos de *P. penetrans* produzidos por planta nos solos com textura mais arenosa. Foi obtida correlação negativa entre a produção da bactéria por planta e o teor de argila do solo. Observou-se, ainda, maior número de endósporos/g de raiz nas plantas cultivadas em areia; entretanto, devido ao baixo peso de raiz seca, a produção total da bactéria foi menor, comparativamente aos demais tratamentos ($P < 0,01$). Verificou-se maior número de endósporos da bactéria aderidos aos J2 de *M. javanica* na camada superficial dos solos de textura mais leve e menor nos solos de textura mais pesada. A maioria dos endósporos de *P. penetrans* em areia de rio foi levada para o fundo dos vasos com a percolação da água, mas não em solos argilosos ou arenosos.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*, *Pasteuria penetrans*, produção massal, textura do solo, propriedades químicas do solo.

Summary - Production of *Pasteuria penetrans* 'in vivo' in soils with different textures and in the sand. **Nematologia Brasileira** .

The mass production and the attachment of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne javanica* J2 were evaluated in soils of different textures and in river sand, in the greenhouse. Tomato seedlings of the Santa Cruz group were transplanted to pots containing those substrates. The upper 5cm layer of the substrate was infested with *P. penetrans* (1×10^5 endospores/g soil), and each plant was inoculated with 2000 J2. Seventy days later, the plants were harvested, the roots were washed, dried, weighed and ground. The number of endospores/g of root and the number of endospores per plant were estimated. Soil samples (50 cm^3) were collected from upper layer (0-5 cm depth) and from the bottom (17-20cm) of each pot, dried and infested with 600 J2 of *M. javanica* to evaluate the endospore percolation by observing the number of endospores per juvenile, and the percentage of juveniles with attached *P. penetrans*. More endospores/plant were produced in sandy soils compared to clay soils or river sand. Negative correlation was observed between *P. penetrans* production per plant and the soil clay content. Higher number of endospores/g root were observed in the plants growing in sand, but, due the lower dry root weight, the total bacterial mass production was less as compared with other treatments ($P < 0,01$). Soils with lighter texture allowed higher attachment of *P. penetrans* to juveniles of *M. javanica* than heavier soils. Most of the endospores were leached to the bottom of the pot by the percolating water in the sand.

Key words: *Meloidogyne javanica*, *Pasteuria penetrans*, massal production, soil texture; soil physical and chemical characteristics.

INTRODUÇÃO

As bactérias *Pasteuria* spp. Metchnikoff (1988) têm sido investigadas por muitos pesquisadores nas mais diversas regiões do planeta. Além de serem consideradas antagonistas eficientes no controle de fitonematóides, essas bactérias apresentam atributos favoráveis, como: especificidade ao hospedeiro; resistência dos endósporos ao calor e à dessecação; inocuidade ao homem, aos animais e ao meio ambiente; viabilidade dos endósporos por longos períodos de armazenamento; e compatibilidade com outras medidas fitossanitárias, como solarização ou aplicação conjunta com nematicidas e fungicidas (Campos, 1992; Hats & Dickson, 1992; Giannakou *et al.*, 1997; Melki *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2000). No entanto, por serem parasitas obrigatórios, sua produção massal é realizada “in vivo” no nematóide, parasitando sua planta hospedeira em casa de vegetação (Stirling & Watchel, 1980), da qual se obtém um pó fino de raiz contendo a bactéria.

Vários relatos na literatura têm demonstrado a grande potencialidade de *P. penetrans* (Thorne) Sayre & Starr como agente de controle biológico do nematóide das galhas (Brown *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1996; Chen & Dickson, 1998). Entretanto, parece que vários fatores interferem em sua eficiência. Dentre estes, o efeito de propriedades do solo atua decisivamente sobre o parasitismo de *P. penetrans* (adesão, infecção e colonização) em seu nematóide hospedeiro. Estudos sobre a influência de propriedades físicas do solo, como umidade (Stirling & Watchel, 1980; Brown & Smart, 1984; Oostendorp *et al.*, 1990; Mateille *et al.*, 1996) e temperatura (Stirling, 1981; Hatz & Dickson, 1992; Freitas *et al.*, 1997); de propriedades químicas, como o pH, a disponibilidade de nutrientes e a capacidade de troca catiônica (CTC) (Mateille *et al.*, 1995; Mateille *et al.*, 1996; Trudgill *et al.*, 2000); e de efeitos biológicos devidos a interações no ambiente rizosférico (Duponnois *et al.*, 1997; Duponnois & Ba, 1998; Duponnois *et al.*, 1999) são alvos de muitas especulações sobre o comportamento da bactéria.

Têm-se em geral que solos de textura mais arenosa favorecem as dispersões de *P. penetrans* e de populações de *Meloidogyne* spp. De acordo com Spauill (1984), Dickson *et al.* (1994) e Mateille *et al.* (1995), solos mais arenosos favorecem a adesão dos endósporos a juvenis de *Meloidogyne* spp. e também a sua retenção nas camadas mais superficiais do solo. Dickson *et al.* (1994) observaram juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp., com endósporos de *P. penetrans* aderidos, em profundidades de até 122 cm em solos arenosos da Flórida, EUA. Conforme esses autores, solos com menor porosidade, alto conteúdo de argila e matéria orgânica ou outro fator desconhecido podem restringir o movimento descendente dos endósporos com a percolação da água. Todavia, em alguns casos, *P. penetrans* parece adaptar-se bem a solos argilosos (Verdejo-Lucas, 1992; Trudgill *et al.*, 2000). Embora Mateille *et al.* (1995) tenham observado maiores infecções de *Meloidogyne* spp. pela bactéria em solos arenosos, a presença de argila nestes solos favoreceu a retenção dos endósporos nos horizontes superficiais. Pesquisas sobre a influência de fatores abióticos do solo sobre *P. penetrans* têm sido conduzidas, principalmente, para avaliar a disponibilidade e adesão dos endósporos da bactéria ao nematóide, ou para observação e associação do seu efeito biocontrolador; contudo, raras são as investigações sobre a interferência desses fatores na sua produção massal para utilização como inóculo em controle biológico.

Diante do exposto, propôs-se neste trabalho avaliar a reprodução de *P. penetrans* em *M. javanica* (Treub) Chitwood (Netcher & Sikora) parasitando plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) em solos com texturas distintas para a produção massal da bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção massal de *P. penetrans* em solos de diferentes texturas

Estudou-se a influência da textura de quatro solos diferentes e da areia de rio sobre a produção de *P. penetrans* em *M. javanica* parasitando tomateiro. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS, sob temperatura ambiente de $27 \pm 5^\circ\text{C}$, entre os meses de janeiro e abril de 2000. Cada tratamento correspondeu a um tipo de solo contendo planta, bactéria e nematóide e apresentou sete repetições com delineamento inteiramente ao acaso.

Os substratos estudados foram coletados nos municípios de Camaquã, Cristal e Pelotas ('Pelotas', horizonte B e areia de rio), Rio Grande do Sul, sendo, logo após a coleta, secos ao sol, destorroados, peneirados e esterilizados em autoclave por uma hora, a 120°C . Posteriormente, foram submetidos às análises granulométricas e químicas (Anônimo, 1997; Tedesco *et al.*, 1995; Lemos & Santos, 1982), cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de análises granulométricas e químicas dos solos testados

Solos	pH H ₂ O	M.O. %	K --mg/dm ³ --	P	Al ----cmol _e /dm ³ ----	Ca	Mg	CTC	Areia	Silte	Argila	classe textural
Cristal	5,3	4,5	132	37,8	0,0	3,0	1,1	3,43	81,0	17,2	8,9	areia-franca
Pelotas	4,4	1,7	220	160,0	0,9	1,8	0,5	2,76	65,2	3,4	11,4	franco-arenoso
Camaquã	4,8	2,7	86	5,8	0,7	11,1	4,1	16,11	25,8	34,5	39,7	franco-argiloso
Horizonte B	5,0	0,2	44	0,8	3,1	1,3	3,6	8,11	32,9	7,8	49,3	franco-argilo-arenoso
Areia	6,7	0,1	17	8,8	0,0	0,4	0,1	0,54	99,0	1,0	0,0	arenoso

Utilizou-se como inóculo de *P. penetrans* o isolado P25, obtido de *M. arenaria* raça 1 na Flórida, EUA, e multiplicado em *M. javanica* em raízes de

tomateiro, em Viçosa-MG, de acordo com metodologia descrita por Stirling & Watchel (1980), das quais se obteve um pó fino de raízes contendo os endósporos. A concentração da bactéria por grama de pó de raiz foi determinada segundo Souza (1997). Uma população de *M. javanica*, oriunda de Viçosa-MG e mantida em tomateiro em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, foi utilizada como inóculo do nematóide. Juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* foram obtidos de raízes de tomateiro através da combinação dos métodos de Hussey & Barker (1973) e do funil de Baermann modificado (Pitcher & Flegg, 1968).

Cada unidade experimental foi constituída de solo e areia, adubada de acordo com os resultados da análise química, seguindo as recomendações para a cultura do tomateiro (Anônimo, 1995), e logo após foi acondicionada em vaso plástico de 4 kg de capacidade. A seguir, adicionou-se pó de raiz com *P. penetrans* (Stirling & Watchel, 1980) a um 1 kg de solo de cada vaso previamente separado do restante, em quantidades que resultaram em 1×10^5 endósporos/g solo. A fração contendo a bactéria foi homogeneizada e depositada no interior de cada vaso, sobre o solo sem a bactéria, preenchendo cerca de 5 cm superficiais. Em seguida, efetuou-se o plantio de uma muda de tomateiro do grupo Santa Cruz por vaso, sendo estas adubadas semanalmente com solução nutritiva, em quantidades definidas de acordo com a composição de cada solo (Anônimo, 1995). Decorridos 15 dias do transplante, 2.000 J2 de *M. javanica* foram adicionados ao solo de cada vaso e distribuídos, circularmente, a 4 cm de distância da planta de tomate.

Setenta dias após a inoculação, as plantas foram colhidas e o sistema radicular separado da parte aérea, lavado e seco ao sol por uma semana. Posteriormente, as raízes foram mantidas em estufa a 38°C por uma hora, pesadas (peso de raiz seca = PRS) e moídas, para obtenção de um pó de raiz fino. A quantificação dos endósporos contidos no pó de raiz foi realizada segundo o método descrito por Souza (1997), com pequenas modificações. Amostras de 0,5 g de pó de raiz, acondicionadas em placas de Petri, foram umedecidas com 2 mL de uma solução de pectinase (Clarex, Miles do Brasil- 15.000 ajdv/g) e

celulase (Sigma Chemical Ltda- 5.000 un.) a 2% e incubadas a 37°C por três horas. Decorrido o período de incubação, cada amostra foi transferida para um cadinho, onde se adicionaram 5 mL de água destilada, para maceração da amostra durante quatro minutos. Feita a maceração, o volume da suspensão do pó de raiz contendo *P. penetrans* foi elevado para 50 mL pela adição de água destilada. As amostras foram então acondicionadas em tubos plásticos e armazenadas em refrigerador a 8°C, para posterior contagem de endósporos em câmara de Newbauer e determinação do número de endósporos por grama de raiz (NEGR) e do número de endósporos por planta (NEPL). O PRS e os valores transformados em \sqrt{x} de NEGR e NEPL foram analisados estatisticamente, comparando-se as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. O NEPL obtido nos quatro diferentes solos e respectivos teores de argila, areia e silte foram submetidos à análise de correlação de Pearson (SAS System 8.0, SAS Institute, Cary, NC-USA). No entanto, os dados referentes ao NEPL obtidos no substrato areia não foram submetidos à análise de correlação, por não ser considerado como solo.

Adesão de endósporos de *P. penetrans* a J2 de *M. javanica* em solos de diferentes texturas

Após a coleta das raízes, retirou-se uma amostra de 100 cm³ de cada solo ou de areia, dos primeiros 5 cm (solo misturado com a bactéria) e do fundo de cada vaso (17-20 cm abaixo da superfície), para avaliação da adesão de endósporos aos J2. As amostras foram secas ao sol por uma semana e, posteriormente, secas em estufa por 24 horas, visando eliminar os nematóides remanescentes. Alíquotas de 50 cm³ dessas amostras de solo foram colocadas em placas de Petri e infestadas, cada, com 600 J2 de *M. javanica* em 22 mL de água. Em seguida, as amostras foram levadas para a incubação, onde permaneceram no escuro, por três dias, a 25°C. Decorrido esse intervalo, procedeu-se à extração dos nematóides do solo por meio de lavagem e peneiramento da amostra (Cobb, 1918). O material retido na peneira de 0,037 mm de abertura (400 mesh) foi

transferido para um béquer, para contagem do número de endósporos aderidos por J2 (NEJ2) e determinação da percentagem de adesão (%J2AD) em 20 nematóides escolhidos ao acaso, utilizando-se microscópio invertido. Os valores de NEJ2 das profundidades de 0-5 cm e 17-20 cm foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, submetidos à análise de variância e analisados estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Os dados de %J2AD, transformados para arco seno x, foram analisados pelo teste de Tukey a 1% (0-5 cm) e 5% (17-20 cm) de probabilidade. Os valores de NEJ2 obtidos nos quatro diferentes solos e respectivos teores de argila, areia e silte foram submetidos à análise de correlação de Pearson (SAS System 8.0, SAS Institute, Cary, NC-USA). Entretanto, os dados referentes ao NEJ2 obtidos no substrato areia não foram submetidos à análise de correlação, por não ser considerado como solo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção massal de *P. penetrans* em solos de diferentes texturas

O maior número de endósporos de *P. penetrans*/g de raiz (NEGR) foi obtido de plantas de tomate cultivadas no solo Pelotas (franco-arenoso) e na areia de rio ($P < 0,01$), conforme Tabela 2. Apesar de ter sido verificada concentração alta da bactéria por grama de pó de raiz dos tomateiros desenvolvidos na areia, a produção de raízes pelas plantas foi muito pequena, o que, provavelmente, se deve às características físicas do substrato, pouco favoráveis ao crescimento da espécie vegetal (Tabela 1).

Os níveis mais altos da bactéria por planta (NEPL) foram detectados nos solos de textura mais arenosa, Pelotas (franco-arenoso) e Cristal (areia franca), os quais diferiram significativamente dos demais tratamentos (Tabelas 1 e 2). De

Tabela 2 - Efeito de diferentes solos sobre produção de matéria seca de raiz (PRS), número de endósporos/g de raiz (NEGR) e número de endósporos/planta (NEPL) de *P. penetrans* em tomateiros inoculados com *M. javanica* em casa de vegetação

SOLOS		PRS	**NEGR	**NEPL
Classe textural	Local			
Areia franca	Cristal	4,35 a*	7,82 x 10 ⁸ b	3,21 x 10 ⁹ a
Franco-arenoso	Pelotas	1,98 b	1,01 x 10 ⁹ ab	1,97 x 10 ⁹ a
Franco-argiloso	Camaquã	1,39 bc	6,83 x 10 ⁸ b	9,22 x 10 ⁸ b
Franco-argilo-arenoso	HB	0,54 bc	5,78 x 10 ⁸ b	2,62 x 10 ⁸ c
-	Areia	0,13 c	1,68 x 10 ⁹ a	2,10 x 10 ⁸ c
CV (%)		41,20	17,55	19,59

* Médias, nas colunas, seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

** Dados transformados em \sqrt{x} .

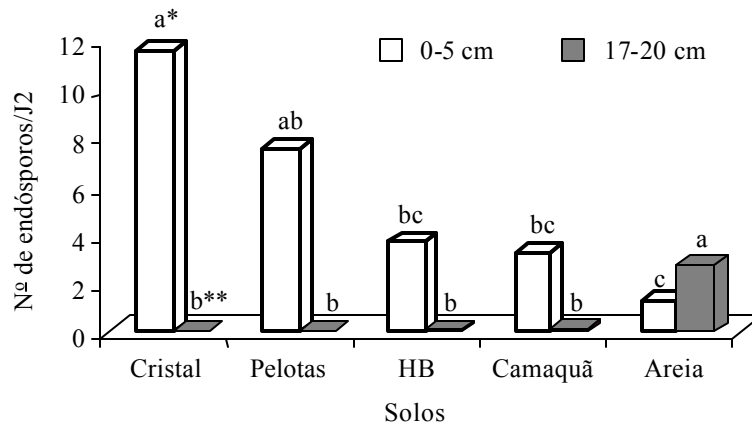
acordo com Sawadogo *et al.* (2000), o tipo de solo é um fator determinante no desenvolvimento das populações de *Meloidogyne* spp., afetando, principalmente, sua distribuição entre o solo e as raízes da planta hospedeira. Além do mais, a ocorrência de juvenis de *Meloidogyne* spp. com endósporos de *P. penetrans* em um solo parece estar intimamente associada à sua textura, sendo mais freqüentemente observada em solos arenosos (Spaull, 1984; Oostendorp *et al.*, 1990; Dickson *et al.*, 1994; Mateille *et al.*, 1995). Dessa forma, solos de textura mais leve facilitariam a movimentação e migração dos nematóides às raízes, aumentando, conseqüentemente, suas chances de encontrar endósporos da bactéria e de penetrar nas raízes (Prot, 1979; Mateille *et al.*, 1995). No entanto, a presença de argila em solos arenosos parece exercer papel importante, impedindo a percolação de endósporos das camadas superficiais para aquelas mais profundas (Mateille *et al.*, 1995), como deve ter ocorrido com o substrato areia de rio, cujo teor de argila era nulo (Tabela 1).

Nos solos de textura mais argilosa (Camaquã e Horizonte B), o NEGR e o NEPL de *P. penetrans* foram menores que nos demais substratos (Tabela 2). Encontrou-se correlação negativa ($R^2 = -0,9593$, $P = 0,04$) entre o NEPL obtido nos diferentes solos com os respectivos teores de argila (Tabela 1). A baixa produção da bactéria em tais solos pode ter ocorrido, em parte, devido à maior dificuldade de migração e de penetração dos J2 nas raízes após a inoculação, à menor reinfestação da planta pelo nematóide, ou mesmo à baixa adesão dos endósporos de *P. penetrans* aos J2 de *M. javanica* (Figura 1). De acordo com Duchaufour (1991), à medida que a quantidade de partículas de argila no solo aumenta, o tamanho dos poros diminui, reduzindo, assim, a sua permeabilidade e a percolação da água, as quais podem influenciar o transporte de juvenis de *Meloidogyne* spp. e dos endósporos de *P. penetrans* (Mateille *et al.*, 1995; 1996). Além do mais, a maior quantidade de argila em um solo pode aumentar a capacidade de adsorção eletroquímica dos endósporos da bactéria sobre os colóides do solo, sendo estes adsorvidos às partículas de argila possivelmente por pontes de cátions com Ca^{2+} e Mg^{2+} , tornando-os indisponíveis ao encontro e à adesão aos J2 de *Meloidogyne* spp. (Afolabi *et al.*, 1995; Mateille *et al.*, 1995; Sawadogo *et al.*, 2000).

Por outro lado, os menores valores de NEGR e NEPL nesses solos podem também ter resultado do menor desenvolvimento e peso do sistema radicular, devido, principalmente, à baixa disponibilidade de fósforo às plantas ocasionada pela sua retenção em grande parte aos colóides do solo (Malavolta, 1978), mesmo tendo recebido aplicações periódicas de solução contendo o nutriente.

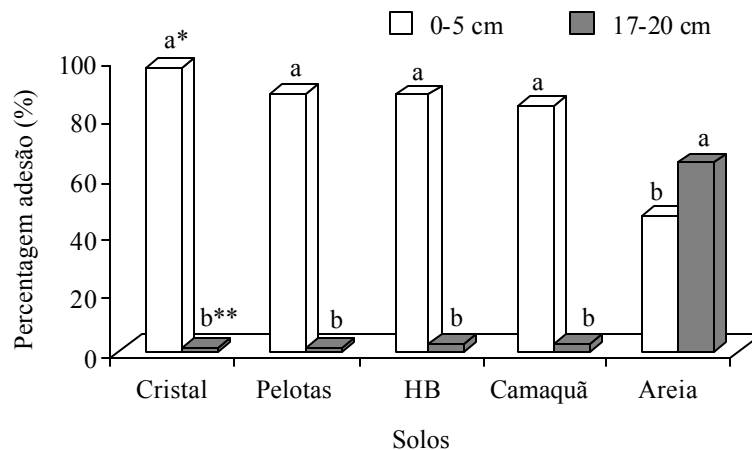
Adesão de endósporos de *P. penetrans* a J2 de *M. javanica* em solos de diferentes texturas

Nas Figuras 1 e 2 são apresentadas, respectivamente, as médias do número de endósporos da bactéria aderidos por nematóide e as médias das



*Médias, nas colunas brancas, seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $\alpha=0,01$; CV=25,87%.** Médias, nas colunas cinzas, seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $\alpha=0,05$; cv=56%.

Figura 1 - Média dos números de endósporos de *P. penetrans* aderidos a J2 de *M. javanica* (dados transformados $\sqrt{x + 0,5}$) introduzidos na camada superficial (0-5 cm) e final (17-20 cm) dos vasos contendo os diferentes solos, 70 dias após a incorporação da bactéria.



* Médias, nas colunas brancas, seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $\alpha=0,01$; CV=16,33%.**Médias, nas colunas cinzas, seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, $\alpha=0,1$; cv=86,99%.

Figura 2 - Porcentagem de juvenis de *M. javanica* com endósporos de *P. penetrans* (arco seno x) na camada superficial (0-5 cm) e final (17-20 cm) dos vaso contendo os diferentes solos, 70 dias depois da incorporação da bactéria.

percentagens de J2 de *M. javanica* infectados por *P. penetrans* nos diferentes solos, 70 dias após a incorporação do pó de raiz aos diversos tratamentos. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas quanto à percentagem de J2 com endósporos aderidos (%J2AD) na camada superior dos solos de Cristal, Pelotas, Camaquã e HB (97,2 - 83,2%), o percentual de J2 aderidos com *P. penetrans* foi aproximadamente 50% menor na areia (Figura 2). Entretanto, observou-se que o número de endósporos/J2 (NEJ2) diferiu entre os diversos tratamentos (Figura 1).

Por meio da análise da Figura 1, pode-se verificar que os maiores índices de adesão (NEJ2) foram obtidos nos solos de textura mais leve (Cristal e Pelotas), correspondendo aos tratamentos em que houve maior produção da bactéria (Tabela 2). Também foi possível observar correlação positiva ($R^2= 0,99$, $P= 0,01$) entre o teor de areia dos diferentes solos (Tabela 1) e o NEJ2 encontrado na camada superior dos solos onde a bactéria foi incorporada. Esses resultados concordam com os obtidos por Mateille *et al.* (1996), os quais verificaram que juvenis de *Meloidogyne* spp. infectados por *P. penetrans* eram mais numerosos em solos de textura arenosa e com aproximadamente 10% de argila. De acordo com esses autores, em solos arenosos o movimento do nematóide e o encontro com a bactéria podem ser facilitados devido à sua maior porosidade; no entanto, a presença de alto conteúdo de argila poderia afetar diretamente a percolação dos esporos, tendo-se uma situação intermediária, conforme observado nos solos arenosos de Cristal e Pelotas (Tabela 1 e Figura 1). Dessa forma, um certo percentual de argila em um solo arenoso poderia garantir que menor número de endósporos fosse perdido e lixiviado para camadas mais inferiores.

Os baixos valores de NEJ2 e %J2AD detectados na camada superficial do tratamento areia devem-se, possivelmente, à lixiviação da maioria dos endósporos incorporados a esse substrato com a água de irrigação durante o período de execução do ensaio de produção massal. Essas observações são confirmadas pelos valores de adesão encontrados nas camadas inferiores dos substratos testados (Figuras 1 e 2), pois tanto a %J2AD ($P<0,01$) como o NEJ2

($P < 0,05$) foram mais elevados na areia. Estudos feitos por Oostendorp *et al.* (1991) corroboram esses resultados, uma vez que, segundo esses autores, a estrutura particular dos solos arenosos sem partículas de argila favoreceria a evasão passiva dos esporos da bactéria para fora do horizonte rizosférico, diminuindo, assim, a sua adesão aos nematóides (Singh & Dhawan, 1992).

Apesar de ter ocorrido alta percentagem de adesão nos juvenis presentes nos solos de textura mais pesada, Camaquã e HB (Figura 2), o NEJ2 foi de três a quatro vezes inferior àquele observado nos solos arenosos Pelotas e Cristal, verificando-se, portanto, correlação negativa ($R^2 = -0,91$, $P = 0,08$) do teor de argila com o NEJ2 encontrado na camada superficial desses solos. Portanto, os baixos valores da adesão obtidos nos solos mais argilosos podem ser atribuídos à ocorrência de dois fenômenos: redução da mobilidade dos J2 de *M. javanica* devido à sua estrutura compacta, limitando, conseqüentemente, o encontro destes com os endósporos da bactéria (Prot & Van Gundy, 1981); e possível aprisionamento dos endósporos de *P. penetrans* aos colóides da argila, tornando-se estes indisponíveis ao contato com o nematóide (Dabiré *et al.*, 1996; Mateille *et al.*, 1996).

Considerando-se que apenas 20 a 30% dos endósporos de *P. penetrans* são capazes de germinar no corpo do nematóide (Sayre & Wergin, 1977; Stirling, 1984) e que em solos argilosos pode haver necessidade de introduzir maior concentração da bactéria, a fim de promover uma adesão à cutícula dos J2 semelhante àquela obtida em areia (Souza & Campos, 1998), seria imprescindível a observação de tais fatores na implementação de um programa de controle biológico no campo. Portanto, tomando-se por base a produção massal de *P. penetrans* em substratos com textura predominantemente pesada, seria necessária a introdução de concentrações mais elevadas da bactéria/g solo para aumentar as chances de germinação dos endósporos sobre a cutícula do J2 no interior das raízes, o que proporcionaria o desenvolvimento de fêmeas colonizadas pelo hiperparasita. Como *P. penetrans* só se multiplica em seu nematóide hospedeiro e os nematóides das galhas reproduzem-se com maior intensidade em solos arenosos, há maior chance de que o nível populacional da

bactéria resulte em supressividade do solo em condições de texturas mais arenosas.

Por meio dos resultados, pode-se verificar que tanto o uso de solos muito argilosos quanto o emprego de areia de rio para produção massal de *P. penetrans* não permitiram a obtenção de grande número de endósporos. Entretanto, o cultivo da planta hospedeira em solos com textura mais arenosa, contendo aproximadamente 10% de argila, levou a uma produção mais elevada da bactéria. Esses resultados concordam com os testes de adesão, em que também foi possível correlacionar os maiores valores de adesão às características físicas dos solos estudados.

BIBLIOGRAFIA

- AFOLABI, P.; K.D. DAVIES & P.S. O'SHEA. 1995. The eletrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 244-249.
- ANÔNIMO. 1995. Comissão De Fertilidade Do Solo – RS/SC. Recomendações de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 3^aed. Passo Fundo: SBCS-Núcleo Regional Sul, 223p.
- ANÔNIMO. 1997. EMBRAPA-CNPS. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: 212p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos; 1)
- BROWN, S.M.; J.L. KEPNER & G.C. SMART. 1985. Increased crop yield following application of *Bacillus penetrans* to field plot infested with *Meloidogyne incognita*. *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 483-486.
- BROWN, S.M. & G.C. SMART. 1984. Attachment of *Bacillus penetrans* to *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 14: 171-172.
- CAMPOS, V.P. 1992. Perspectivas do controle biológico de nematóides. *Revista Informe Agropecuário*, 16: 26-30.
- CHEN, Z.X. & D.W. DICKSON. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology*, 30:313-340.

- CHEN, Z. X., D. W. DICKSON, R. MCSORLEY, D. J. MITCHELL, & T. E. HEWLETT. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology* 28:159-168.
- COBB, N.A. 1918. Estimating the nema population of the soil. *Agric. Tech. Circ. Bur. Pl. Ind. U.S. Dep. Agric.*, no. 1.
- DABIRÉ, K.R.; T. MATEILLE; M.T. DIOP.; S. N'DIAYES; & R. DUPONNIS. 1996. Influence of the soil on the availability of *Pasteuria penetrans* to parasitize nematodes in the genus *Meloidogyne*. *Nematropica*, 26: 252-253.
- DICKSON, D.W.; M. OOSTENDORP; R. GIBLIN-DAVIES & D.J. MITCHELL 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. Pp 575-601 in D. ROSEN, F.D. BENNETT & J.L. CAPINERA. eds. *Pest management in the subtropics. Biological control- a Florida perspective*. Andover, UK: Intercept.
- DUCHAUFOUR, P. 1991. *Pédologie. Sol, végétation, environnement*. Masson, Paris, 289p.
- DUPONNOIS, R. & A. BA. 1998. Influence of the microbial community of a shael soil on the interactions between *Meloidogyne javanica* and *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 44: 331-343.
- DUPONNOIS, R.; C. NETCHER & T. MATEILLE. 1997. Effects of the rizosphere microflora on *Pasteuria penetrans* parasitizing *Meloidogyne graminicola*. *Nematologia Mediterranea*, 25: 99-109.
- DUPONNOIS, R.; A. BA & T. MATEILLE. 1999. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. *Nematology*, 1(1): 95-101.
- FREITAS, L.G.; MITCHELL & D.W. DICKSON. 1997. Temperature effects on attachment of *P. penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1 on tomato. *Journal of Nematology*, 29: 547-55.
- FREITAS, L.G.; D.J. MITCHELL; D.W. DICKSON & D.O. CHELLEMI. 2000. Soil solarization and organic amendment effects on *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira*, 24(2):133-146.
- GIANNAKOU, I.O.; B. PEMBROKE; S.R. GOWEN & K.G. DAVIES. 1997. Effects of long-term storage and above-normal temperature on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 43: 185-192.

- HATZ, B. & D.W. DICKSON. 1992. Effect of temperature on attachment, development and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 24: 512-521.
- HUSSEY, R.S. & K.R BARKER. 1973. A comparasion of methods of collection inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028..
- LEMOS, R.C. & R.D. SANTOS. 1982. Manual de descrição e coleta de solos no campo. SBPC, 2^a edição, Campinas-Sp.
- MALAVOLTA, E. 1978. Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo. Ed. Ceres, SP. 528p.
- MATEILLE T.; R. DUPONNIS & M.T. DIOP. 1995. Influence des facteurs telluriques abiotiques et de la plante hôte sur l'infection des nématode phytoparasites du genre *Meloidogyne* par l'actinomicète parasitoide *Pasteuria penetrans*. *Agronomie*, 15: 581-591.
- MATEILLE T.; R. DUPONNIS; K. DABIRÉ; S. N'DIAYES & M.T. DIOP. 1996. Influence of the soil on the transport of phytoparasitic of the spores of *Pasteuria penetrans*, parasite of nematodes of the genus *Meloidogyne*. *European Journal of Soil Biology*, 32(2):81-83.
- MELKI, K.C.; I.O. GIANNAKOU; B. PEMBROKE & R.GOWEN. 1998. The cumulative build-up of *Pasteuria penetrans* in root-knot nematode infested soil and the effect of soil applied fungicides on its infectivity. *Fundamental Applied Nematology*, 21(6): 679-683.
- METCHNIKOFF, E. 1888. *Pasteuria ramosa*, un représentant des bactéries à division longotudinale. *Ann. Inst. Pasteur*, 2:165-170.
- OOSTENDORP, M.; D.W. DICKSON & D.J. MITCHEL 1990. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southern United States. *Journal of Nematology*, 22: 525-531.
- OOSTENDORP, M., D. W. DICKSON, & D. J. MITCHELL. 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 23:58-64.
- PITCHER, R.S. & J.J.M. FLEGG. 1968 An improved final separation sieve for the extraction of plant-parasitic nematodes from soil debris. *Nematologica*, 14: 123-127.
- PROT, J.C. 1979. Horizontal migrations of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* in sand in concentration gradients of salts and in a moisture gradient. *Revue de Nématologie*, 2:17-21.

- PROT, J.C. & S.D. VAN GUNDY. 1981. Effect of the soil texture and the clay component on migration of *Meloidogyne incognita* juveniles. *Journal of Nematology*, 13: 213-217.
- SAYRE, R. M. & W. P. WERGIN. 1977. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology*, 12(2):1091-1101.
- SAWADOGO, A.; M.T. DIOP; B. THIO; Y.A., KONATE. & T. MATEILLE. 2000. Influence des facteurs agronomiques sur les populations de *Meloidogyne* spp. et leurs principaux organismes parasites en culture maraîchère sahélienne. *Nematology*, 2(8):895-906.
- SINGH, B. & S.C. DHAWAN. 1992. Effect of soil texture on attachment of bacterial spores of *Pasteuria penetrans* to the second-stage juveniles of *Heterodera cajani*. *Indian Journal of Nematology*, 22:72-74.
- SOUZA, J.T. 1997. Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, 112p.
- SOUZA, J.T. & V.P. CAMPOS. 1998. Quantificação de endósporos de *Pasteuria penetrans* em solo e raízes. *Nematologia Brasileira*, 22(1): 22-31.
- SPAULL, V.W. 1984. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. *Revue de Nématologie*, 7: 277-282.
- STIRLING, G.R. 1981. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 27: 458-462.
- STIRLING, G.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, Leiden, 74(1): 55-69.
- STIRLING, G.R. & M.G. WATCHEL. 1980. Mass production of *Pasteuria penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, Leiden, 26: 308-312.
- TEDESCO, M.J.; C. GIANELLO; C.A. BISSANI; H. BOHNEN & S.J. VOLKWEISS. 1995. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS. 174p.
- TRUDGILL, D.L.; G. BALA; V.C. BLOCK; A. DAUDI; K.G. DAVIES; S.R. GOWEN; M. FARGETTI; J.P. MADULU; T. MATEILLE; W. MWAGENI; C. NETCHER; M.S. PHILLIPS; A. SAWADOGO; C.G. TRIVINO & E. VOYOUKALLOU. 2000. The importance of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biological agent. *Nematology*, 2(8); 823-845.

VERDEJO-LUCAS, S. 1992. Seasonal population fluctuation of *Meloidogyne* spp. and the *Pasteuria penetrans* group in kiwi orchards. *Plant Disease*: 76: 1275-1279.

**EFEITO DO NÚMERO DE ENDÓSPOROS DE *Pasteuria penetrans* E
DO MÉTODO DE PROMOÇÃO DA ADESÃO SOBRE A
PENETRAÇÃO DE *Meloidogyne javanica* E PRODUÇÃO DA
BACTÉRIA EM TOMATEIRO**

Resumo - Efeito do Número de Endósporos de *Pasteuria penetrans* e do Método de Promoção da Adesão Sobre a Penetração de *Meloidogyne javanica* e Produção da Bactéria em Tomateiro. **Nematologia Brasileira** .

Estudou-se o efeito de *Pasteuria penetrans* sobre a penetração de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.), inoculando-se 1.000 J2 aderidos com 0, 10, 30, 60 ou 90 endósporos/J2, através do borbulhamento das suspensões de nematóides e bactérias, sendo as plantas inoculadas mantidas em câmara de crescimento por 10 dias a 27°C e fotoperíodo de 12 horas. Logo após, as raízes foram colhidas e coloridas com fucsina ácida, para contagem do número de nematóides por sistema radicular, selecionando-se a classe (número de endósporos/J2) que permitiu maior penetração do nematóide. Verificou-se que a média de 10 endósporos/J2 proporcionou a penetração de 50% dos nematóides em relação à testemunha, e o aumento do número de endósporos aderidos aos J2 acima dessa média reduziu drasticamente a penetração nas raízes pelos nematóides. Posteriormente, os métodos de adesão por borbulhamento, agitação, centrifugação e repouso foram comparados entre si quanto ao coeficiente de variação (CV) do número de endósporos/J2 em tubos plásticos com 15 mL de suspensão de 500 J2 e endósporos na concentração de 1×10^5 endósporos/mL. Com o objetivo de estudar o efeito das variações na adesão sobre a multiplicação da bactéria, plantas de tomate mantidas em casa de vegetação foram inoculadas com 1.000 J2, com média de 10 endósporos/J2, aderidos pelo método de borbulhamento, centrifugação ou agitação. Setenta dias após a inoculação, as raízes foram colhidas, avaliadas quanto ao número de galhas e ovos e, logo após, secas ao sol para moagem, determinação do peso seco e do número de endósporos produzidos. Observou-se grande CV do número de

endósporos/J2, maior número de galhas e produção de ovos/planta usando-se o método de borbulhamento. Apesar de o método de agitação ter proporcionado maior uniformidade na adesão, obteve-se menor número de endósporos produzidos, comparado àquele obtido por centrifugação e borbulhamento ($P < 0,01$).

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*, *Pasteuria penetrans*, penetração, métodos de adesão, produção massal.

Summary - Effect of *Pasteuria penetrans* endospore number and method of attachment promotion on *Meloidogyne javanica* root penetration and mass production of the bacteria in tomato plants. **Nematologia Brasileira** .

The effect of *Pasteuria penetrans* on penetration of *Meloidogyne javanica* in tomato roots was studied in the growth chamber. The tomato plants were inoculated with 1000 J2 carrying 0, 10, 30, 60 or 90 endospores attached to their cuticle by bubbling juvenile and endospore water suspensions. The inoculated plants were incubated for 10 days at 12-hours photoperiod and 27°C. The root system was collected and stained with acid fuchsin to evaluate the number of juveniles that penetrated the roots. Attachment of 10 endospores/J2 reduced penetration by 50% compared to endospores-free J2, and was further reduced as number of attachment increased. Subsequently, the attachment promoting methods of air bubbling, shaking, centrifugation and stationary were compared by calculating the coefficient of variation (CV) of attachment among juveniles in plastic tubes containing 15 mL suspension of 500 *M. javanica* J2 and endospores (1×10^5 /mL). To evaluate the effect of attachment on the *P. penetrans* reproduction, plants in the greenhouse were inoculated with 1000 J2 carrying an average of 10 endospores each. The attachment was promoted through air bubbling, centrifugation or shaking. Seventy days after the inoculation, roots were collected and, the egg and gall numbers were evaluated, before drying the roots to determine the dry weight and amount of endospores produced. A high variation in endospore number /J2 and number of gall and egg per plant was observed using the air bubbling method. Even though the shaking method yielded more uniform attachment, the number of endospores produced was lower than that obtained in the centrifugation and in the air bubbling methods ($P < 0,01$).

Key words: *Meloidogyne javanica*, *Pasteuria penetrans*, penetration, attachment methods, mass production.

INTRODUÇÃO

Pasteuria penetrans (Thorne) Sayre & Starr tem sido referida em vários trabalhos como parasita de diversos fitonematóides (Mankau, 1975; Sturhan *et al.*, 1988; Chen & Dickson, 1998). Apesar de 323 espécies de nematóides incluídos em 116 gêneros serem relatados como hospedeiros de *Pasteuria* spp. (Chen & Dickson, 1998), seu potencial como agente biocontrolador tem sido estudado principalmente para as espécies do gênero *Meloidogyne* Goeldi (Stirling, 1984; Tzortzakakis *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2000). Este antagonista pode atuar no controle de *Meloidogyne* spp. impedindo a fêmea de produzir ovos (Sayre & Wergin, 1977), ou mesmo impedindo o juvenil de penetrar nas raízes (Stirling, 1984; Brown *et al.*, 1985). Além do mais, *P. penetrans* apresenta vários atributos favoráveis à sua utilização, como: especificidade ao hospedeiro; resistência dos endósporos ao calor e à dessecação; inocuidade ao homem e meio ambiente; viabilidade dos endósporos por longos períodos de armazenamento; e uso compatível com as práticas agrícolas de solarização e aplicação de nematicidas ou fungicidas (Campos, 1992; Hats & Dickson, 1992; Freitas *et al.*, 2000; Melki *et al.*, 1998).

Por ser um parasita obrigatório, o modo mais eficiente de produzir grandes quantidades dessa bactéria é através da inoculação de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. infestados com endósporos em uma planta hospedeira suscetível, em casa de vegetação. Aproximadamente 45-60 dias após a inoculação, as raízes são colhidas, secas e moídas, para obtenção de um pó de raiz fino (Stirling & Wachtel, 1980), que pode ser utilizado como fonte de inóculo no biocontrole do nematóide das galhas. O uso da hidroponia para produção de *P. penetrans* é mencionado como uma possível alternativa para produção da bactéria (Serracin *et al.*, 1994), entretanto ainda não se dispõe de dados experimentais empregando-se esta técnica. Várias tentativas para cultivo “in vitro” de *Pasteuria* spp. já foram realizadas, porém pouco sucesso tem sido obtido (Verdejo & Jaffee, 1988; Williams *et al.*, 1989; Gowen & Ahamed, 1990;

Bishop & Ellar, 1991; Reise *et al.*, 1991). Dessa forma, a produção de *P. penetrans* “in vivo” tem sido o único meio de sua multiplicação.

Desde 1980, quando Stirling e Watchel (1980) propuseram a primeira técnica para produção massal de *P. penetrans*, vários trabalhos têm sido feitos na busca de métodos que possibilitem a otimização desse processo. Dentre estas investigações, fatores como densidade de inóculo, concentração da bactéria, planta hospedeira para o nematóide, período de colheita, regime de irrigação e temperatura foram relacionados como principais causas que afetam o número de endósporos produzidos (Stirling *et al.*, 1990; Sharma & Stirling, 1991; Davies *et al.*, 1991; Hatz & Dickson, 1992; Ciancio & Bourijate, 1995; Chen & Dickson, 1997; Freitas *et al.*, 1997; Giannakou *et al.*, 1997). Entretanto, outros aspectos, como número de endósporos aderidos ao nematóide (Sekhar & Gill, 1990; Stirling *et al.*, 1990; Davies *et al.*, 1991), técnica de inoculação (Cho *et al.*, 1997), método de adesão da bactéria ao nematóide (Gomes *et al.*, 1999) e textura do solo (Mateille *et al.*, 1995), devem ser considerados.

A supressão natural de *Meloidogyne* spp. por *P. penetrans* está associada a solos com grandes proporções de J2 contendo endósporos aderidos ao seu corpo (Mankau, 1980; Stirling & White, 1982). A redução da penetração desses nematóides na planta está relacionada, entre outros fatores, à concentração da bactéria no solo (Stirling, 1981; Brown & Smart, 1984; Mateille *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1988) e ao número de endósporos aderidos à cutícula dos J2 (Davies *et al.*, 1988, 1991). A grande maioria dos trabalhos abordando a dinâmica entre o nível de inóculo de *P. penetrans* e a infecção do nematóide hospedeiro é direcionada ao biocontrole do agente fitoparásita, sendo pouco estudados, portanto, os aspectos relacionados à produção massal da bactéria (Stirling, 1984; Stirling *et al.*, 1990; Sharma, 1992; Davies *et al.*, 1988; Sekhar & Gill, 1990).

Devido à especificidade parasitária de *P. penetrans*, técnicas especiais para adesão dos endósporos aos nematóides são necessárias no estudo da gama de hospedeiros, em testes de eficiência e em sua reprodução (Hewlett & Serracin, 1996). De acordo com Hewlett & Dickson (1993), estas investigações têm sido

baseadas no movimento do nematóide no solo (Brown *et al.*, 1985), na água (Channer & Gowen, 1988), no ágar (Verdejo & Jaffe, 1988), ou na agitação de suspensões em água com o nematóide e a bactéria (Bird, 1986; Davies *et al.*, 1988; Oostendorp *et al.*, 1990). Gomes *et al.* (1999), comparando diferentes métodos de adesão através da movimentação forçada por borbulhamento, centrifugação e agitação de suspensões aquosas contendo *P. penetrans* e J2 de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (Netcher & Sikora), ou pelo movimento natural dos J2 (repouso), verificaram grande coeficiente de variação no número de endósporos aderidos/J2 usando-se o método de borbulhamento. Conforme Freitas & Carneiro (2000), o uso de um método que possibilite menor variação na adesão pode resultar em maior percentagem de J2 aderidos pela bactéria e experimentos com resultados mais consistentes.

A utilização de *P. penetrans* no biocontrole de nematóides requer o estabelecimento de um sistema de produção prático e eficiente. Dessa maneira, objetivou-se avaliar alguns aspectos relacionados à produção da bactéria em *M. javanica* em tomateiro, investigando-se a relação entre o nível de adesão de endósporos aos J2 e sua penetração na planta hospedeira, assim como o efeito do uso de diferentes métodos de adesão sobre a reprodução da bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio 1. Penetração de juvenis de *M. javanica* com diferentes números de endósporos de *P. penetrans* em sua cutícula, em raízes de tomateiro

Neste bioteste avaliou-se a penetração de juvenis de *M. javanica*, com média de 0, 10, 30, 60 ou 90 endósporos de *P. penetrans* aderidos a sua cutícula, em raízes de tomateiro. O ensaio constou de cinco tratamentos, correspondentes a cinco classes distintas de endósporos/J2 e seis repetições, sendo estas dispostas completamente ao acaso em câmara de crescimento.

Utilizou-se como inóculo do nematóide uma população de *M. javanica* mantida em tomateiro, em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa-MG. Juvenis de segundo estágio foram coletados das raízes de tomateiro infectadas por *M. javanica* por meio da combinação dos métodos de Hussey & Barker (1973) e funil de Baermann modificado (Pitcher & Flegg, 1968). Utilizou-se o isolado P25 de *P. penetrans* proveniente da Flórida, EUA, o qual foi mantido em casa de vegetação em plantas de tomate do grupo Santa Cruz parasitadas por *M. javanica*. Fêmeas do nematóide infectadas por *P. penetrans* foram retiradas das raízes, colocadas em um tubo de ensaio e maceradas, para obtenção de uma suspensão de endósporos.

Plantas de tomate do grupo Santa Cruz com 45 dias de idade mantidas em vasos plásticos de 500 mL, em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, foram inoculadas, cada, com 1.000 J2 de *M. javanica*, com a bactéria sob as diferentes classes de número de endósporos de *P. penetrans*/J2 (Tabela 1). A adesão dos endósporos à cutícula dos J2 foi promovida pelo borbulhamento da suspensão dos nematóides e endósporos da bactéria (1×10^5 endósporos/mL), separadamente, para os diferentes tratamentos. O borbulhamento das diversas suspensões foi mantido até que fossem atingidos os níveis de adesão correspondentes às quatro classes (médias de 10, 30, 60 e 90 endósporos/J2), sendo o número médio de endósporos/J2 determinado pelas contagens em 20 nematóides escolhidos ao acaso, com o uso de microscópio óptico.

Decorridos 10 dias da inoculação, as raízes foram lavadas, separadas da parte aérea e coloridas com fucsina ácida (Byrd *et al.*, 1983), para contagem do número de juvenis penetrados por sistema radicular. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial, sendo o ajuste da equação verificado pelo modelo raiz quadrada e R^2 , por meio do Sistema de Análise Estatística e Genética - SAEG (Euclides, 1983). A partir dos resultados encontrados neste ensaio, selecionou-se a classe de endósporos/J2 que permitiu a maior penetração dos nematóides para utilização nos ensaios subsequentes de produção massal.

Ensaio 2. Comparação de diferentes métodos de adesão de endósporos de *P. penetrans* a juvenis de *M. javanica*

Bioteste 1: Variância do número de endósporos de *P. penetrans* em J2 de *M. javanica* comparando-se diferentes métodos de adesão.

Para a avaliação das variações dos números de endósporos aderidos entre os J2 observados, utilizaram-se diferentes métodos de adesão, tendo-se por objetivo selecionar o método que proporcionasse menos J2 sem *P. penetrans* e maior uniformidade de adesão entre os J2.

Os métodos de adesão de endósporos de *P. penetrans* a J2 de *M. javanica* em suspensão aquosa foram: borbulhamento, centrifugação, agitação e repouso. Utilizaram-se três repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída de um tubo de ensaio plástico de 50 mL de capacidade, contendo 500 J2 de 0 a 48 horas de idade, com 15 mL da suspensão do nematóide a uma concentração de 1×10^5 endósporos de *P. penetrans*/mL. A média do número de endósporos aderidos por J2 foi semelhante entre as diferentes condições de adesão testadas. Em cada repetição de cada método de adesão, o número de endósporos aderidos/J2 foi contado em 20 J2 escolhidos ao acaso, por tubo, com o auxílio de um microscópio invertido no aumento de 400X. Os inóculos do nematóide e da bactéria utilizados neste ensaio foram obtidos conforme descrito para o ensaio 1.

Sob borbulhamento (Stirling & Watchel, 1980), cada tubo contendo a suspensão do nematóide com a bactéria recebeu uma mangueira plástica, que injetou um fluxo de ar gerado por uma bomba elétrica de aquário (6V) por três minutos. No método de centrifugação modificado (Hewlett & Dickson, 1993), os tubos contendo o nematóide e *P. penetrans* em suspensão aquosa foram tampados e centrifugados a 178 g (1.000 rpm) por três minutos. Na condição de agitação (Davies *et al.*, 1988), os tubos contendo a suspensão do nematóide com a bactéria foram tampados e agitados em agitador orbital por 28 minutos a 130 rpm. Para a suspensão em repouso (Mankau & Prasad, 1977), a bactéria foi adicionada aos tubos contendo *M. javanica*, sendo estes tampados e deixados em

repouso por quatro horas. Todos os testes foram conduzidos em temperatura ambiente de laboratório ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

Bioteste 2: Efeito de diferentes métodos de adesão sobre a reprodução de *P. penetrans* em tomateiro

Para determinação de um método que resultasse em maior número de endósporos por sistema radicular de plantas de tomate, realizou-se um ensaio em casa de vegetação.

Mudas de tomateiro do grupo Santa Cruz mantidas em vasos plásticos de 2 litros de capacidade com 1.800 g de uma mistura de solo e areia (2:1 v:v) foram inoculadas com 1.000 J2 de *M. javanica* de 0 a 4 dias de idade, com número médio de 10 endósporos de *P. penetrans*/J2. Cada tratamento constou de sete repetições em delineamento completamente casualizado. As adesões foram realizadas conforme descrito no bioteste 1, e o tempo e a velocidade requeridos variaram conforme o método utilizado para o número médio de endósporos/J2 desejado: borbulhamento = 20'24''; centrifugação = 5'30'' a 178,8 g (1.000 rpm); e agitação = 233' a 130 rpm.

Setenta dias após a inoculação, as plantas foram colhidas, separando-se o sistema radicular da parte aérea. A seguir, as raízes foram lavadas e avaliadas quanto a número de galhas, percentagem de parasitismo em 20 fêmeas retiradas ao acaso de tomateiros/tratamento e número de ovos/sistema radicular. A extração de ovos foi realizada, manualmente, conforme método descrito por Hussey & Barker (1973), sendo o número de ovos/raiz (NOR) quantificado em câmara de Peters. Posteriormente, as raízes foram secas ao sol, pesadas (peso de raiz seca = PRS) e moídas individualmente, para obtenção de um pó fino de raiz (Stirling & Watchel, 1980), do qual foi determinado o número de endósporos produzido por grama de raiz (NEGR) e por planta (NEPL), conforme metodologia descrita por Souza (1997). O PRS e o IG, bem como os valores NOR, NEGR e NEPL transformados em \sqrt{x} , foram submetidos a análise de

variância, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio 1. Penetração de juvenis de *M. javanica*, com diferentes números de endósporos de *P. penetrans* aderidos, em raízes de tomateiro

A penetração do nematóides nas raízes de tomateiro foi inversamente proporcional ao número médio de endósporos que os juvenis de *M. javanica* apresentavam em sua cutícula ($P < 0,01$) ao serem inoculados na planta (Figura 1). Observou-se que uma média de 10 endósporos/J2 foi capaz de causar redução de 50% no número de J2 que conseguiu penetrar nas raízes, quando comparados à testemunha. Adesões acima de 30 endósporos/J2 promoveram aumento menos acentuado na redução da penetração do nematóide (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Davies *et al.* (1988). Ao inocularem juvenis de *M. incognita* infestados com 15 e 25 endósporos/J2, em tomateiro, os autores observaram reduções de 72 e 80% na penetração de raízes, respectivamente. Conforme Sekhar & Gill (1990), o decréscimo na penetração do nematóide devido à infestação por *P. penetrans* pode ser atribuído tanto à redução do movimento do juvenil como à dificuldade de reconhecimento entre as biomoléculas liberadas pelas raízes e aquelas presentes nos sítios receptores sobre o seu corpo.

Nos tratamentos em que as plantas foram inoculadas com juvenis infestados com uma média de 60 ou 90 endósporos/J2 (Figura 1 e Tabela 1), verificou-se que os nematóides foram capazes de movimentar-se no solo e penetrar nas raízes em percentagens de 5,90 a 10,94% do que penetrariam se não tivessem endósporos sobre suas cutículas. Apesar de Stirling (1984) ter

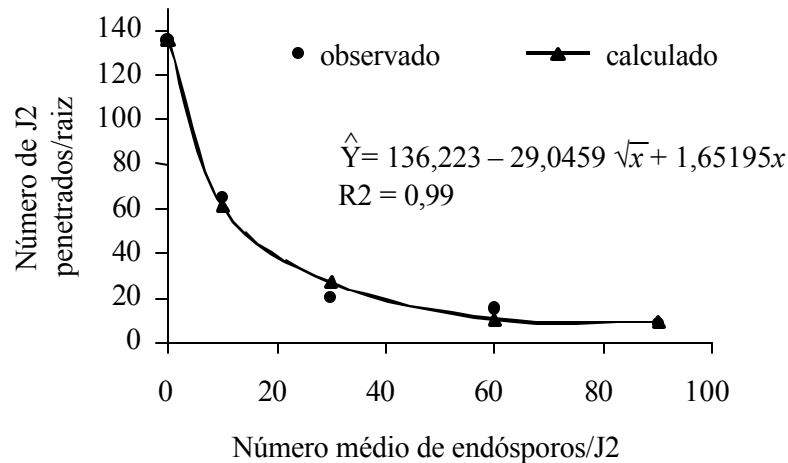


Figura 1 - Número de juvenis de *M. javanica* penetrados por sistema radicular de tomateiro em função dos níveis de 0, 10, 30, 60 ou 90 endósporos de *P. penetrans* /J2, dez dias após a inoculação.

Tabela 1 - Percentagem de penetração de J2 de *M. javanica* em raízes de tomateiro aderidos com 0, 10, 30, 60 ou 90 endósporos de *P. penetrans* por nematóide

Número de endósporos /J2			CV adesão (%)	Penetração (%)
classe	média	variação		
I	0	-	-	100,00
II	10	(5-14)	30,00	50,00
III	30	(21-39)	21,33	15,50
IV	60	(34-69)	18,88	10,94
V	90	(61-118)	16,88	5,90

observado que a presença de 40 ou mais endósporos de *P. penetrans* em J2 de *M. javanica* impediu a penetração do nematóide, Sekhar & Gill (1990) também constataram que adesões de 70 e 90 endósporos/J2 ainda permitiram a penetração de 64 e 36% de J2 de *M. incoginta* nas raízes, respectivamente. Portanto, mesmo na presença de elevado número de endósporos aderidos à cutícula dos juvenis, é possível ocorrer a sua penetração nas raízes da planta hospedeira. Tzortzakakis *et*

al. (1997), estudando a variação na distribuição de frequência do número de endósporos aderidos em diferentes populações de *Meloidogyne* spp., verificaram que isolados com alta capacidade de adesão nem sempre garantem maior redução na produção de ovos. De acordo com esses autores, esse fato foi atribuído à alta variância na adesão dos endósporos e à infectividade dos nematóides. Entretanto, uma pequena redução no número de ovos produzidos na presença da bactéria pode ser devida a um posterior descolamento dos endósporos durante o movimento dos juvenis no solo (Ratnasoma *et al.*, 1991). Da mesma forma, Tzortzakakis & Gowen (1994) e Tzortzakakis *et al.* (1996) verificaram que indivíduos dentro de uma única espécie ou em uma mistura de espécies do nematóide podem escapar à adesão dos endósporos e à infecção pela bactéria.

Comparando as médias do número de endósporos/J2 (Tabela 1), observa-se que o coeficiente de variação é mais alto para números menores de endósporos aderidos por J2, e este é reduzido à medida que se aumenta o índice de adesão. Tzortzakakis *et al.* (1997) observaram aumento da variância no número de endósporos por J2 com o aumento da concentração da bactéria. Segundo esses autores, o aumento na variância pode ser atribuído à distribuição desigual dos endósporos nos espaços à volta do nematóide ou a diferenças entre a suscetibilidade de nematóides individuais. No entanto, pesquisas adicionais precisam ser conduzidas para elucidar e explicar esse fenômeno.

De acordo com os dados obtidos neste ensaio (Figura 1), uma média de 10 endósporos/J2 resultou no maior número de nematóides com *P. penetrans* estabelecidos na raiz, evidenciando, assim, que a taxa de adesão da bactéria pode ser um fator preponderante dentro de um programa de produção massal. Conforme Stirling (1984), um elevado número de endósporos de *P. penetrans* aderidos a juvenis de *M. javanica* pode levar a baixa sobrevivência e penetração do nematóide no hospedeiro. Por outro lado, estima-se que pelo menos três a cinco endósporos devam estar aderidos à cutícula de cada J2 para que ocorra a germinação de pelo menos um deles, promovendo, assim, a infecção e o parasitismo da fêmea (Sayre & Wergin, 1977; Stirling, 1984). Dessa forma, é importante que sejam utilizados nas inoculações das plantas hospedeiras juvenis

com número médio de endósporos que proporcionem maior quantidade da bactéria produzida por planta ou por grama de pó de raiz, obtendo-se alto percentual de parasitismo e evitando elevado escape do nematóide à infecção pela bactéria.

Ensaio 2. Comparação de diferentes métodos de adesão de endósporos de *P. penetrans* a juvenis de *M. javanica*

Bioteste1 - Variância do número de endósporos de *P. penetrans* em J2 de *M. javanica* comparando-se diferentes métodos de adesão

Por meio da análise dos resultados deste experimento, observou-se grande variação do número de endósporos aderidos a juvenis de *M. javanica* utilizando-se diferentes métodos de adesão para médias de 13,95 a 22,25 endósporos/J2 (Tabela 2). A maior variabilidade dos valores de adesão foi detectada quando se utilizou o método de borbulhamento (Tabela 2). De acordo com Freitas & Carneiro (2000), o uso de um método que possibilite menor variação na adesão de endósporos de *P. penetrans* pode resultar em maior percentagem de J2 infestados com a bactéria e em experimentos com respostas mais consistentes.

Tabela 2 - Variação de parâmetros relacionados à adesão de *P. penetrans* a J2 de *M. javanica* utilizando-se os métodos de borbulhamento, centrifugação, agitação e repouso

Método	nº end/J2*	Desvio-padrão* (σ)	CV Adesão* (%)
Borbulhamento	14,66	8,06	55,22
Centrifugação	21,80	6,49	29,73
Agitação	19,58	2,92	19,41
Repouso	12,81	3,50	27,61

* Média de três repetições.

Os menores coeficientes de variação da adesão obtidos utilizando-se os métodos de agitação, repouso ou centrifugação indicam menor variabilidade do número de endósporos aderidos/J2 (Tabela 2). A adesão por centrifugação ou sem movimento da suspensão resultou em acurácia intermediária, comparada ao teste de adesão por agitação (Tabela 2); Freitas & Carneiro (2000) resumiram que estes métodos resultam em grande desuniformidade do número de endósporos aderidos por J2. Entretanto, os menores CV de adesão obtidos nos dois métodos aqui testados se devem, possivelmente, a diferenças nas condições experimentais, pois, no caso da centrifugação, Hewlett & Dickson (1993) empregaram uma rotação de 9.500g e utilizaram tubos do tipo Ependorf de 0,25 mL, menores do que os utilizados neste bioteste. De acordo com Freitas & Carneiro (2000), empregando-se o método de Hewlett & Dickson (1993), os endósporos de *P. penetrans* ficariam aderidos apenas aos nematóides das camadas superficiais, ocorrendo ainda o emaranhamento destes juvenis pelo contato com a bactéria, o que, provavelmente, reduziria o seu movimento no solo e a sua penetração nas raízes. No entanto, o uso de uma rotação de centrifugação aproximadamente nove vezes menor do que a empregada por Hewlett & Dickson (1993) deve ter contribuído para redução dos problemas anteriormente relacionados. Pode-se inferir, portanto, que não apenas o método utilizado para a adesão é importante, como também as condições em que os métodos são conduzidos.

De acordo com os resultados da Tabela 2, verifica-se que a menor variabilidade da adesão detectada no método do agitador pode ser atribuída ao movimento mais uniforme da suspensão, promovendo, assim, maior contato entre os J2 e os endósporos da bactéria. Embora os elevados coeficientes de variação da adesão, obtidos através dos métodos de centrifugação, 'repouso' e borbulhamento, sejam explicados, em parte, pelo contato desuniforme entre *P. penetrans* e os J2 (Freitas & Carneiro, 2000), outras causas, como temperatura, salinidade e pH da suspensão, idade dos J2 e dos endósporos, ou outras forças físicas devem estar atuando no encontro, na atração e na coesão dos endósporos da bactéria aos nematóides.

Bioteste 2: Efeito de diferentes métodos de adesão sobre a reprodução de *P.*

penetrans em tomateiro

Juvenis de *M. javanica* com endósporos de *P. penetrans* aderidos através do método de borbulhamento ou centrifugação e inoculados em mudas de tomate proporcionaram maior número de endósporos produzidos por grama de raiz (NEGR) e por planta (NEPL), quando comparados com aqueles J2 nos quais a bactéria foi aderida sob condições determinadas pelo agitador orbital (Tabela 3). A utilização destes dois métodos de adesão resultou em maiores coeficientes de variação do número de endósporos entre os J2 dos respectivos tratamentos, confirmando os dados obtidos nos testes “in vitro” do bioteste 1 (Tabela 2).

Tabela 3 - Efeito da utilização de três métodos de adesão de *P. penetrans* a J2 de *M. javanica* sobre coeficiente de variação da adesão (CV), parasitismo do nematóide pela bactéria, número de galhas (NG), peso de raiz seca (PRS), produção de ovos/sistema radicular (NOR), produção do número de endósporos por grama de raiz (NEGR) e por planta (NEPL)

	Métodos de Adesão		
	Borbulhamento	Centrifugação	Agitação
CV adesão (%)	56,71	37,00	28,80
Parasitismo (%)	70,00	60,00	85,00
NG	1154,71 a*	366,14 b	489,42 b
PSR (g)	3,06 ns	3,58 ns	3,27 ns
NOR**	9,96 x 10 ⁴ a	2,15 x 10 ⁴ b	1,97 x 10 ⁴ b
NEGR**	9,60 x 10 ⁷ a	7,96 x 10 ⁷ a	1,84 x 10 ⁷ b
NEPL**	2,96 x 10 ⁸ a	2,72 x 10 ⁸ a	5,93 x 10 ⁷ b

* Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

** Dados transformados em \sqrt{x} .

Embora os métodos de adesão por borbulhamento e centrifugação tenham proporcionado quantidades semelhantes de endósporos produzidos, $2,72 \times 10^8$ e $2,96 \times 10^8$ endósporos/planta, respectivamente, observou-se maior número de galhas e ovos quando as plantas foram inoculadas com J2 aderidos pelo método de borbulhamento (Tabela 3). Isso se deve, provavelmente, ao elevado coeficiente de variação da adesão por borbulhamento, o qual resultou no escape de muitos juvenis à infecção por *P. penetrans*, pois 45% destes apresentavam média inferior a oito endósporos/J2 (Figura 2), permitindo, assim, uma produção de ovos quatro a cinco vezes maior, comparada àquela obtida nos demais tratamentos ($P < 0,01$). O escape do nematóide à infecção pode ser atribuído à baixa germinação dos endósporos aderidos à cutícula dos J2. De acordo com Sayre & Wergin (1977) e Stirling (1984), apenas 20-30% dos endósporos germinam, sendo necessária, portanto, a presença de pelo menos três a cinco destes para que ocorram a infecção e o parasitismo do nematóide. Segundo Sturhan *et al.* (1994), a baixa germinação de endósporos aderidos à cutícula de juvenis de *Heterodera goettingiana* Liebscher foi atribuída à presença de muitos endósporos vazios. Da mesma forma, existem evidências de que o tubo germinativo emitido pela bactéria pode, algumas vezes, não atravessar a cutícula do nematóide (Sturham *et al.*, 1994).

Analisando a Figura 2, observa-se uma frequência 15% mais baixa do número de J2 com até oito endósporos quando se utilizou a adesão por centrifugação, em comparação ao borbulhamento. Embora possa ter ocorrido menor escape dos J2 à infecção (Sayre & Wergin, 1977; Stirling, 1984) utilizando-se o primeiro método, a ausência de diferença estatística para produção de endósporos ($P > 0,01$) entre estes tratamentos deve-se, possivelmente, ao escape dos juvenis à colonização pela bactéria utilizando-se o método de adesão por borbulhamento e à redução da penetração de nematóides nas raízes quando a adesão foi conduzida pela centrifugação, pois um número maior de nematóides apresentou mais de nove endósporos aderidos/J2, proporcionando NEGR e NEPL (Tabela 3) semelhantes em ambos os métodos.

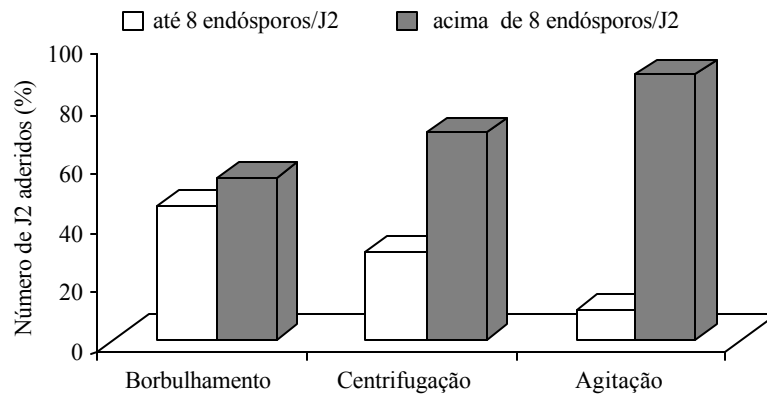


Figura 2 - Percentagem do número de J2 de *M. javanica* com endósporos de *P. penetrans* conforme distribuição das frequências de endósporos/J2 para os métodos de adesão por borbulhamento, centrifugação e agitação.

De acordo com os dados da Tabela 3, o maior percentual de parasitismo de *M. javanica* por *P. penetrans* foi obtido de fêmeas retiradas das raízes de tomateiros, nas quais os juvenis inoculados foram previamente submetidos à adesão pela agitação da suspensão em agitador orbital. Com base nos resultados dos biotestes 1 e 2 (Tabelas 2 e 3), pode-se inferir que o alto percentual de fêmeas parasitadas provenientes de J2 aderidos pelo método do agitador pode estar diretamente relacionado ao baixo coeficiente de variação da adesão, proporcionado, possivelmente, pela maior uniformidade do número de endósporos da bactéria aderidos aos J2 contidos na suspensão (Freitas & Carneiro, 2000). Da mesma forma, analisando os resultados da Figura 2, verifica-se que elevado percentual de J2 com mais de oito endósporos (90%) pode ter permitido que maior número de juvenis tenha sido colonizado por *P. penetrans*, evitando assim o escape de nematóides à infecção pelo antagonista. Entretanto, o número mais elevado de endósporos/J2, obtido pelo método de agitação, pode ter privado muitos J2 de infectarem as plantas, por terem sua mobilidade comprometida, o que resultou em menores NEGR e NEPL, comparados à produção da bactéria utilizando-se os métodos de adesão por borbulhamento e centrifugação.

A redução da penetração de *Meloidogyne* spp. tem sido confirmada em vários biotestes onde foi estudado o nível de controle do nematóide das galhas, sendo a infecção da espécie hospedeira gradualmente diminuída com o aumento do percentual de J2 infestados pela bactéria e com o aumento do número de endósporos de *P. penetrans* aderidos por J2 (Stirling, 1984; Davies *et al.*, 1988; Stirling *et al.*, 1990; Sekhar & Gill, 1990; Davies *et al.*, 1991; Gowen *et al.*, 1998; Sharma & Gomes, 1999). Portanto, para a produção massal mais eficiente, é desejável que se compense essa redução ao aumentar o número de J2 inoculados por planta de tomate.

De acordo com os resultados observados neste estudo, verificou-se que tanto o número de endósporos da bactéria aderidos ao corpo do nematóide quanto o método utilizado para promover sua adesão à cutícula dos J2 foram fatores fundamentais tanto na produção massal de *P. penetrans* como na produção de inóculo bacteriano mais uniforme veiculado em nematóides. No entanto, do ponto de vista da produção massal, apesar de o borbulhamento e a centrifugação possibilitarem maior número de endósporos produzidos, o método de borbulhamento é mais prático e barato, considerando-se os equipamentos utilizados.

BIBLIOGRAFIA

- BISHOP, A.H. & D.J. ELLAR, 1991. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* *in vitro*. *Biocontrol Science and Technology*, 1:101-114, 1991.
- BIRD, A. 1986. The influence of the actinomycete, *Pasteuria penetrans*, on the host-parasite relationship of the plant-parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. *Parasitology*, 93: 571-580, 1986.
- BROWN, S.M. & G.C. SMART. 1984. Attachment of *Bacillus penetrans* to *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 14: 171-172.

- BROWN, S.M.; J.L. KEPNER & G.C. SMART. 1985. Increased crop yield following application of *Bacillus penetrans* to field plot infested with *Meloidogyne incognita*. *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 483-486.
- BYRD, D.W.; T. KIRKPATRICK & K.R. BARKER. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15(1):142-143.
- CAMPOS, V.P. 1992. Perspectivas do controle biológico de nematóides. *Revista Informe Agropecuário*, 16: 26-30.
- CHANNER, A.G. & S.R. GOWEN. 1988. Preliminary studies on the potencial of *Pasteuria penetrans* to control *Meloidogyne* species. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference, Pests and Disease. Surrey, England. The British Crop Protection Council.
- CHEN, Z.X. & D.W. DICKSON. 1997. Effect of ammonium nitrate and time of harvest on mass production of *Pasteuria penetrans*. *Nematropica*: 27: 153-60.
- CHEN, Z.X. & D.W. DICKSON. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology*, 30: 313-340.
- CHO, M.R.; S.Y. NA & M.S. YIEN. 2000. Biological control of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans*. *Journal Asia-Pacific Entomol.*, 3(2):71-76.
- CHO, M.R.; D.W. DICKSON & T.E. HEWLETT. 1997. Comparison of inoculum methods, *Meloidogyne* spp. and different host plants for production of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 29(4):573-574.
- CIANCIO, A. & M. BOURIJATE. 1995. Relationship between *Pasteuria penetrans* infection levels and density of *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Mediterranea*, 23:43-49.
- DAVIES, K.G.; B.R. KERRY & C.A. FLYNN. 1988. Observation on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*, 112: 491-501.
- DAVIES, K.G.; V. LAIRD & B.R. KERRY. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Revue de Nématologie*, 14(4): 611-618.
- EUCLIDES, R.F. 1983. Sistema para análise estatística e genética. SAEG. Viçosa, UFV, 57p.

- FREITAS, L.G. & R.M.D.G. CARNEIRO. 2000. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* spp. P.91-125. In: MELO, I.S, & J.L. AZEVEDO. Controle Biológico. Embrapa Meio Ambiente, 388p.
- FREITAS, L.G.; D.J. MITCHELL & D.W. DICKSON. 1997. Temperature effects on attachment of *P. penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1 on tomato. *Journal of Nematology*, 29: 547-55.
- FREITAS, L.G.; D.J. MITCHELL; D.W. DICKSON & D.O. CHELLEMI. 2000. Soil solarization and organic amendment effects on *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira*, 24(2):133-146.
- GIANNAKOU, I.O; B. PEMBROKE; S.R. GOWEN & K.G. DAVIES. 1997. Effects of long-term storage and above-normal temperature on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 43: 185-192.
- GOMES, C.B.; L.G. FREITAS & A.M.S.A. ALMEIDA. 1999. Comparação de métodos para adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* a juvenis de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, 24:345. (Resumo).
- GOWEN, S.R. & R. AHAMED. 1990. *Pasteuria penetrans* for control of pathogenic nematodes. *Aspects of Applied Biology*, 24:25-32.
- GOWEN, S.R.; E.A. TZORTZAKAKIS & A.G. DE R. CHANNER. 1998. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by the parasite *Pasteuria penetrans* as influenced by the initial nematode populations density. *Nematologica*, 44:369-379.
- HATZ, B. & D.W. DICKSON. 1992. Effect of temperature on attachment development and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 24: 512-521.
- HEWLETT, T.E. & D.W. DICKSON. 1993. A centrifugation method for attaching endospores of *Pasteuria* spp. to nematodes. Supplement to *Journal of Nematology*, 25(4S): 785-788.
- HEWLETT, T. & M. SERRACIN. 1996. *Pasteuria* spp. as biological control agents. Workshop Manual, University of Florida, 9p.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods for collection inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- MANKAU, R. 1975. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26: 333-339.
- MANKAU, R. 1980. Biological control of *Meloidogyne* populations by *Bacillus penetrans* in West Africa. *Journal of Nematology*, 12:230

- MANKAU, R. & N. PRASAD. 1977. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 9:40-45.
- MATEILLE T.; R. DUPONNIS & M.T. DIOP. 1995. Influence des facteurs telluriques abiotiques et de la plante hôte sur l'infection des nematode phytoparasites du genre *Meloidogyne* par l'actinomicète parasitoïde *Pasteuria penetrans*. *Agronomie*, 15: 581-591.
- MATEILLE T.; R. DUPONNIS; K. DABIRÉ; S. N'DIAYES & M.T. DIOP. 1996. Influence of abiotic soil factors and the host plant on the infection of phytoparasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* by *Pasteuria penetrans*. *European Journal Soil Biology*, 32(2):81-83.
- MELKI, K.C.; I.O. GIANNAKOU; B. PEMBROKE & R.GOWEN. 1998. The cumulative build-up of *Pasteuria penetrans* in root-knot nematode infested soil and the effect of soil applied fungicides on its infectivity. *Fundamental and Applied Nematology*, 21(6): 679-683.
- OOSTENDORP, M.; D.W. DICKSON & D.J. MITCHEL 1990. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southern United States. *Journal of Nematology*, 22: 525-531.
- PITCHER, R.S. & J.J.M. FLEGG. 1968. An improved final separation sieve for the extration of plant-parasitic nematodes from soil debris. *Nematologica*, 14: 123-127.
- RATNASOMA, H.A.; S.R. GOWEN & N.G.M. HAUGE. 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.
- REISE, R.W.; K.T. HACKETT & R.N. HUETELL. 1991. Limited cultivation of *Pasteuria nishizawa*. *Journal of Nematology*, 23(4):547-548 (abstr.).
- SAYRE, R.M. & W.P. WERGIN. 1977. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology*, 129(2): 1091-1101.
- SEKHAR, N,S, & J.S. GILL. 1990. Penetration and multiplication of *Meloidogyne incognita* as influenced by *Pasteuria penetrans*. *Indian Journal of Nematology*, 20(2): 213-218.
- SERRACIN, M.A; A.C. SCHERGER; D.W. DICKSON; D.P. WEINGARTNER & T. HEWLETT. 1994. An alternative method for culturing *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 22: 565.
- SHARMA, R.D. 1992. Biocontrol efficiency of *Pasteuria penetrans* against *Meloidogyne javanica*. *Ciênc. Biol. Eclo. Syst.*, 12(1/2):43-47.

- SHARMA, R.D. & R. STIRLING. 1991. In vivo mass production systems for *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 37: 483-484.
- SHARMA, R.D. & A.C. GOMES. 1999. Controle biológico de *Meloidogyne arenaria* com *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira*, 23(1):47-52.
- SOUZA, J.T. 1997. Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de lavras, 112p.
- STIRLING, G.R. 1981. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Pasteuria penetrans*. *Nematologia*, 27: 458-462.
- STIRLING, G.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, 74(1): 55-69.
- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant-parasitic nematodes: Progress, problems, and prospects. Wallingford, UK, CAB International. 282p.
- STIRLING, G.R. & M.G. WATCHEL. 1980. Mass production of *Pasteuria penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologia*, 26: 308-312.
- STIRLING, G.R. & A.M. WHITE. 1982. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australian vineyards. *Plant Disease*, 66:52-53.
- STIRLING, G.R.; R.D. SHARMA & J. PERRY. 1990. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. *Nematologica*, 36:246-252.
- STURHAM, D.; R. WINKELHEIDE; R.M. SAYRE & W.P. WERGIN. 1994. Light and electron microscopical studies of cycle and development stages of *Pasteuria* isolate parasitizing the pea cyst nematode, *Heterodera goettingiana*. *Fundamental and Applied Nematology*, 17(1):29-42.
- TZORTZAKAKIS, E.A. & S.R. GOWEN. 1994. Resistance of a population of *Meloidogyne javanica* by the obligate parasite *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 40:258-266.
- TZORTZAKAKIS, E.A., S.R. GOWEN & D.E. GOUMAS. 1996. Decreased ability of *Pasteuria penetrans* spores to attack successive generations of *Meloidogyne javanica*. *Fundamental and Applied Nematology*, 19(2):201-204.
- TZORTZAKAKIS, E.A., A.A. DE R. CHANNER & S.R. GOWEN. 1997. Studies of the potential use of *Pasteuria penetrans* as a biological agent of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*, 46:44-45.

- VERDEJO, S. & B.A. JAFFE. 1988. Reproduction of *Pasteuria penetrans* in a tissue culture system containing *Meloidogyne javanica* and *Agrobacterium rizhogenes*-transformed roots. *Phytopathology*, 8: 1284-1286.
- WILLIAMS, A.B.; G.R. STIRLING; A. HAYWARD & J. PERRY. 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Applied Bacteriology*., 67(2):145-156.

CONCLUSÕES GERAIS

A adição de esterco de curral em substratos contendo solo e areia resultou em maior volume e peso de raízes de tomateiro e reduziu o número de endósporos de *P. penetrans* produzidos por grama de raiz e por fêmea de *M. javanica*. Esterco de curral não afetou o número de endósporos produzidos por planta. A obtenção de pó de raiz com endósporos de *P. penetrans* em substrato composto somente por solo e areia resultou em maior concentração do antagonista por grama do produto, característica desejada dentro das estratégias de controle biológico.

A produção de *P. penetrans* em solos de textura arenosa e previamente infestados com a bactéria permitiu maior multiplicação do antagonista. Os maiores índices de adesão da bactéria a J2 de *M. javanica* analisados no perfil superficial dos solos testados também foram obtidos nos solos de textura mais arenosa. Entretanto, baseando-se nos resultados de adesão obtidos na camada inferior dos solos estudados, verificou-se maior número de endósporos por J2 na areia, indicando, portanto, que grande parte dos endósporos incorporados a esse substrato foi lixiviada pela água de irrigação, o que torna inviável, nessas condições, o uso de areia para o cultivo de *P. penetrans*.

Nos testes de penetração, a média de 10 endósporos/J2 proporcionou maior percentagem do número de nematóides penetrados por sistema radicular. O

aumento do número de endósporos aderidos aos J2 reduziu drasticamente a sua penetração nas raízes. O método de agitação proporcionou maior uniformidade na adesão, porém menor número de endósporos produzidos nas raízes ($P < 0,01$). Nos testes de adesão, o método de borbulhamento proporcionou maior variação do número de endósporos aderidos por J2, maior número de galhas e maior produção de ovos/planta. Os métodos de borbulhamento e centrifugação foram eficientes e não diferiram entre si na produção de endósporos de *P. penetrans* por planta.