

FÁBIO RAMOS ALVES

**ESTRATÉGIAS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO  
MASSAL 'IN VIVO' DE *Pasteuria penetrans***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2004

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

T

A474e  
2004  
Alves, Fábio Ramos, 1970-  
Estratégias para otimização da produção massal 'in vivo'  
de *Pasteuria penetrans* / Fábio Ramos Alves. – Viçosa :  
UFV, 2004.  
x, 93f. : il. ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas - Doenças e pragas - Controle biológico.
  2. *Pasteuria penetrans* - Reprodução - Efeito do esterco.
  3. *Pasteuria penetrans* - Adesão em nematoda.
  4. *Meloidogyne* - Inoculação. 5. Tomate - Inoculação.
  6. Tomate - Raízes - Fisiologia - Efeito do esterco.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 632.96

FÁBIO RAMOS ALVES

**ESTRATÉGIAS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO MASSAL 'IN VIVO'  
DE *Pasteuria penetrans***

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

APROVADA: 27 de agosto de 2004.

---

Prof. Silamar Ferraz  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Renata Maria Strozi Alves Meira

---

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

---

Prof. Luiz Antônio Maffia

---

Prof. Leandro Grassi de Freitas  
(Orientador)

“Quem dentre vós é sábio e entendido? Mostre pelo seu bom trato as suas obras em mansidão de sabedoria. Mas, se tendes amarga inveja, e sentimento faccioso em vosso coração, não vos glorieis, nem mintais contra a verdade. Essa não é sabedoria que vem do alto, mas é terrena, animal e diabólica. Porque onde há inveja e espírito faccioso aí há perturbação e toda obra perversa. Mas a sabedoria que do alto vem é, primeiramente pura, depois pacífica, moderada, tratável, cheia de misericórdia e de bons frutos, sem parcialidade e sem hipocrisia. Ora, o fruto da justiça semeia-se na paz, para os que exercitam a paz”.

**Tiago 3:13-18.**

Aos meus pais Cândido e Aglycia, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim. Aos meus irmãos Fabrício, Edson, Carmelita e Maria das Dores pelo incentivo, e à minha querida amiga Ranielle A. Fagundes Reis.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que está vivo e reina em nossos corações, e sem ele seria impossível caminhar adiante.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos preciosos.

Ao prof. Dr. Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, ensinamentos e, sobretudo, pela amizade e exemplo de seriedade.

Aos professores Silamar Ferraz e Rosângela D'arc de Lima Oliveira, pelas sugestões e críticas que enriqueceram consideravelmente este trabalho.

Ao prof. Luiz Antônio Maffia, pelas críticas e auxílio indispensável nas análises estatísticas.

Aos professores Antônio Jacinto Demuner, Eduardo Euclides de L. e Borges e Renata Maria Strozi Alves Meira, pelas preciosas sugestões e gentileza em ceder espaço em seus laboratórios para que alguns estudos da tese fossem feitos.

Ao dedicado estudante de agronomia Paulo Roberto Pala Martinelli, pelo apoio incansável durante a condução dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora da tese, cujas sugestões e críticas permitiram a redação final deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Nematologia pelo convívio agradável e amizade durante os quatro anos de curso.

A todos os membros de A Igreja de Jesus Cristo dos Santos dos Últimos Dias, minha segunda família, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos.

À Inês Chamel, pelo companheirismo e carinho. Uma inesquecível amiga.

À amável amiga Ranielle A. Reis Fagundes, sempre ao meu lado em todos os momentos. Agradeço pelo seu exemplo de otimismo e bondade que ficarão eternizados em meu coração. Uma verdadeira irmã.

Muito obrigado!

## BIOGRAFIA

**Fábio Ramos Alves**, filho de Cândido Lino Alves e Aglycia Maria Ramos, nasceu em São Simão, Goiás, no dia 23 de janeiro de 1970.

Em Janeiro de 1995 graduou-se em Agronomia pela Fundação do Ensino Superior de Rio Verde/FESURV, Rio Verde, GO.

Em Fevereiro de 1998 concluiu o aperfeiçoamento científico em fitopatologia pela EMBRAPA/CNPMPF, Centro Nacional de pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA.

Em Agosto de 2000, concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia, pela Universidade Federal de Lavras, MG. Neste mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa, MG, concluindo-o em agosto de 2004.

## CONTEÚDO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
3. CAPÍTULO 1	
Produção de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i> em tomateiros de crescimento indeterminado, cv. Santa Clara, versus determinado, cv. TRural I.....	7
RESUMO.....	7
SUMMARY.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
4. CAPÍTULO 2	
Influência da concentração de endósporos e do tempo de agitação da suspensão na adesão de <i>Pasteuria penetrans</i> em <i>Meloidogyne javanica</i> .....	18
RESUMO.....	18
SUMMARY.....	19
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
5. CAPÍTULO 3	
Utilização de população pura ou mista de espécies de <i>Meloidogyne</i> para a produção de <i>Pasteuria penetrans</i> .....	25
RESUMO.....	25
SUMMARY.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

6. CAPÍTULO 4	
Influence of inoculum densities of <i>Meloidogyne</i> species and host plant age on the mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> .....	37
SUMMARY.....	37
RESUMO.....	38
INTRODUCTION.....	39
MATERIAL E METHODS.....	40
RESULTS AND DISCUSSION.....	42
REFERENCES.....	52
7. CAPÍTULO 5	
Influência de esterco de curral e níveis de inóculo de espécies de <i>Meloidogyne</i> na concentração de fenóis em raízes de tomateiro, no teor de lipídios dos nematóides e nas células gigantes induzidas por esses patógenos.....	55
RESUMO.....	55
SUMMARY.....	56
INTRODUCTION.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
8. CAPÍTULO 6	
Produção ‘in vivo’ de <i>Pasteuria penetrans</i> em espécies de <i>Meloidogyne</i> com diferentes níveis do nematóide e de esterco no substrato.....	73
RESUMO.....	73
SUMMARY.....	74
INTRODUÇÃO.....	75
MATERIAL E MÉTODOS.....	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
CONCLUSÕES GERAIS.....	89

## RESUMO

ALVES, Fábio Ramos, D.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004. **Estratégias para a otimização da produção massal ‘in vivo’ de *Pasteuria penetrans***. Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Conselheiros: Silamar Ferraz e Rosângela D’Arc de Lima Oliveira.

Experimentos foram conduzidos em laboratório e casa de vegetação objetivando o aprimoramento do método clássico de multiplicação de *Pasteuria penetrans* ‘in vivo’, proposto em 1980 por Stirling e Wachtel. No primeiro experimento comparou-se a produção de endósporos da *P. penetrans* em raízes de tomateiro de crescimento indeterminado cv. Santa Clara e determinado cv. TRural 1. Maiores pesos de matéria fresca e seca e número de endósporos foram observados em tomateiro cv. Santa Clara. O segundo experimento foi realizado para determinar a concentração ideal de endósporos de *P. penetrans* na suspensão e o tempo de agitação necessário para adesão adequada de endósporos aos nematóides para multiplicação da bactéria. Para que se obtenham seis endósporos, em média, por juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, verificou-se serem necessárias suspensões contendo  $3,3 \times 10^5$  endósporos/mL, agitadas por 10 a 20 minutos, ou  $3,3 \times 10^4$  endósporos/mL por 50 minutos. Em outro ensaio, comparou-se a multiplicação de *P. penetrans* em população pura de *M. incognita* ou em população composta de *M. incognita* e *M. javanica* oriunda de um campo de cultivo de tomate. A produção de endósporos de *P. penetrans* em tomateiro inoculado com *M. incognita* foi aproximadamente três vezes superior àquela em plantas inoculadas com população mista. Realizou-se também um teste de adesão de *P. penetrans* às duas populações do nematóide. Foi observado maior número de endósporos aderidos aos J2 de *M. incognita*. A produção de endósporos da *P. penetrans* em plantas de tomateiro cv. Santa Clara com 15, 30, 45 ou 60 dias de idade e inoculadas com 5.000, 15.000 ou 25.000 J2 foi avaliada. As plantas com 30 e 45 dias de idade inoculadas com 25.000 J2 permitiram a multiplicação de *P. penetrans* cerca de 19 vezes maior àquela obtida em plantas inoculadas com 5.000 J2. Com o objetivo de determinar se maiores níveis de matéria orgânica adicionada ao substrato provocavam alterações

fisiológicas nos nematóides ou nas plantas de tomate, estudou-se a influência de diferentes proporções de solo, areia e esterco de curral (1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 ou 1:1:2 (V:V:V), respectivamente) e três níveis de inóculo de espécies de *Meloidogyne* (3.000, 6.000 e 9.000 J2) sobre a concentração de fenóis em raízes de tomateiro, no teor de lipídios de espécies de *Meloidogyne*, e em possíveis alterações em células gigantes induzidas por esses nematóides. Não se observou efeito dos tratamentos no teor de lipídios dos nematóides. A concentração de fenóis nas raízes aumentou à medida que se acrescentou mais esterco de curral ao substrato ou quando as plantas foram inoculadas com mais nematóides (9.000 J2). As células gigantes em raízes de plantas cultivadas nos substratos 1:1:0 e 2:2:1 (solo:areia:esterco) foram mais numerosas, maiores e com maior número de núcleos. Por outro lado, as células gigantes de plantas cultivadas no substrato 1:1:1 e 1:1:2, além de menos numerosas, apresentaram alterações no tamanho e formato, demonstrando o efeito deletério das maiores doses de esterco sobre esses sítios de alimentação. O último ensaio foi conduzido para avaliar o efeito de crescentes quantidades de esterco de curral nos substratos e níveis de inóculo de espécies de *Meloidogyne* na reprodução de *P. penetrans*. Maior percentual de fêmeas infectadas por *P. penetrans* foi observado quando se utilizou o substrato 1:1:0 em relação aos substratos 1:1:1 e 1:1:2 ou quando as plantas foram inoculadas com 3.000 J2. O experimento foi repetido uma vez e na primeira condução do experimento, plantas cultivadas no substrato 1:1:0 ou inoculadas com 9.000 J2 apresentaram maior número de endósporos; entretanto, na segunda condução do experimento as plantas inoculadas com 9.000 J2 e cultivadas no substrato 2:2:1 foram as que permitiram maior reprodução de *P. penetrans*.

## ABSTRACT

ALVES, Fábio Ramos, D.S., Universidade Federal de Viçosa, August de 2004. **Strategies for improvement of 'in vivo' production of *Pasteuria penetrans***. Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Committee Members: Silamar Ferraz and Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.

Greenhouse and laboratory experiments were conducted to improve the classical method of multiplying *P. penetrans* 'in vivo', proposed by Stirling & Wachtel in 1980. In the first experiment, the mass production of *P. penetrans* in tomatoes of indetermined and determined growth, cv. Santa Clara and Trural I, respectively, was compared. Higher fresh and dry root weight and endospore number were observed in 'Santa Clara' tomato. The second experiment was conducted to determine the best endospore concentration of *P. penetrans* in the aqueous suspension and the time of shaking necessary to obtain adequate attachment of endospores on the nematodes, as the first step for *P. penetrans* multiplication. To obtain an average of six endospores per second stage juvenile (J2) of *M. javanica*, it is necessary to shake suspension of  $3,3 \times 10^5$  endospores/mL per 10 to 20 minutes or to shake  $3,3 \times 10^4$  endospores/mL for 50 minutes. In another experiment, the reproduction of *P. penetrans* in pure population of *M. incognita* and in a mixed population of *M. incognita* and *M. javanica*, originated from the field, was studied. The endospore production of *P. penetrans* in tomato plants inoculated with *M. incognita* was approximately three times higher than in plants inoculated with the field population. An attachment test of *P. penetrans* on the two populations was performed and higher number of endospores attached to J2 of *M. incognita* was observed. The multiplication of *P. penetrans* in 15, 30, 45 or 60 day-old 'Santa Clara' tomato plants inoculated with 5,000, 15,000 or 25,000 J2, was also evaluated. The 30 and 45 days old plants inoculated with 25,000 J2 provided *P. penetrans* multiplication up to nineteen times more than plants inoculated with 5,000 J2 in the first experimental run. To determine if high cow manure levels added to substrate promote physiological changes on the nematodes or on the tomato plants, the influence of cow manure amendment to mixtures of soil and sand giving rates of 1:1:0; 2:2:1; 1:1:1 and 1:1:2

(V:V:V) of soil, sand and manure, respectively, and three inoculum levels of *Meloidogyne* species, i.e., 3,000; 6,000 and 9,000 J2 on the phenolic content in the tomato roots, changes in nematode lipid content and possible alterations in the giant cells induced by the nematodes, were studied. No conclusion could be drawn about the effect of manure on the nematode lipid content. The phenolic content in the roots increased as more cow manure was added to the substrate or when the plants were inoculated with more nematodes (9,000 J2). The giant cells in the roots of plants cultivated in the substrates 1:1:0 and 2:2:1 were more numerous, bigger and with more nuclei. On the other hand, the giant cells of plants cultivated on 1:1:1 and 1:1:2 substrates were less numerous, showed changes on their format and were smaller, demonstrating the deleterious effect of organic amendments to these feeding sites. A subsequent experiment was carried out to evaluate the effect of the interaction of increasing rates of cow manure in the substrates and of nematode levels on the reproduction of *Pasteuria penetrans*. Higher percentage of infected females by *P. penetrans* was observed when the plants grew in the substrate 1:1:0 than in the substrates 1:1:1 and 1:1:2, or when plants were inoculated with 3,000 J2. The experiment was repeated once and in the first run, plants cultivated on substrate 1:1:0 or inoculated with 9,000 J2 had higher endospore number. However, in the second run, plants inoculated with 9,000 J2 and cultivated on substrate 2:2:1 yielded more endospores per root system.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp., estão presentes em todas as regiões agrícolas e parasitam grande número de plantas, cultivadas ou não, e causam grandes perdas na agricultura, chegando a inviabilizar áreas para o plantio. Por essa razão, esses fitonematóides são considerados os mais importantes em todo o mundo (Sasser, 1980).

O controle desses patógenos por meio de nematicidas foi amplamente difundido até que foi comprovado o impacto negativo desses produtos ao ambiente e à saúde humana, o que estimulou a busca de outras medidas de controle dos nematóides, como o controle biológico (Stirling, 1991).

Desde que se iniciou a busca por organismos para o biocontrole de fitonematóides, os fungos e as bactérias têm se destacado como os mais promissores antagonistas desses patógenos (Ferraz & Santos, 1995; Campos et al., 1998). Entre esses, a bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr apresenta o maior potencial de uso como bionematicida devido a sua rusticidade, agressividade e grande potencial de reprodução e disseminação (Cho et al., 1997; Giannakou et al., 1997). Para a multiplicação desse antagonista, inoculam-se plantas de tomate com juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* (Treub) Chitwood infestados por endósporos de *P. penetrans* (Stirling & Wachtel, 1980). As raízes dessas plantas são secas e moídas para a obtenção de um pó de raiz que é utilizado como inóculo da bactéria para aplicações no campo (Stirling & Wachtel, 1980).

No processo de reprodução 'in vivo' é fundamental que os J2 apresentem número adequado de endósporos aderidos as suas cutículas antes da inoculação das plantas. É necessário que os J2 tenham pelos menos três endósporos presos as suas cutículas, pois somente 20-30% dos endósporos aderidos germinam e colonizam o nematóide hospedeiro (Sayre & Wergin, 1977). Por outro lado, menor penetração das raízes ocorre quando eles ficam infestados por muitos endósporos (Brown & Smart, 1985; Davies et al., 1991; Alves et al., 2002).

Algumas tentativas para a multiplicação da *P. penetrans* 'in vitro' foram feitas, porém sem sucesso (Williams et al., 1989; Bishop & Ellar, 1991). Logo, é imprescindível que se busquem técnicas que permitam a maximização da produção de *P. penetrans* 'in vivo', o que tornará ainda mais promissor seu uso como nematicida natural (Campos et al., 1998).

Muitos trabalhos têm sido feitos nesse sentido com o uso de diferentes plantas hospedeiras (Sharma & Stiling, 1991; Cho et al., 1997; Giannakou et al., 1999; Rodrigues et al., 2003), com a incorporação de nitrato de amônio ao substrato (Chen & Dickson, 1997) e com diferentes métodos de inoculação das plantas e níveis de inóculo do nematóide (Cho et al., 1997; Gomes, 2001; Sharma & Stiling, 1991). Métodos de adesão da bactéria ao nematóide e adição de materiais orgânicos ao substrato também têm sido comparados (Gomes, 2001).

Alguns autores afirmam que o nível de inóculo de *Meloidogyne* spp. e a espécie botânica estão entre os fatores mais relevantes na produção de *P. penetrans* (Stirling & Wachtel, 1980; Sharma & Stirling, 1991; Cho et al., 1997; Rodrigues et al., 2003). Porém, a incorporação de materiais orgânicos ao substrato também é importante (Gomes, 2001), pois pode provocar alterações fisiológicas no nematóide ou na planta hospedeira, o que dificulta o desenvolvimento desses patógenos e compromete a reprodução de *P. penetrans*, haja visto que essa bactéria depende do nematóide para completar seu ciclo de vida (Mankau & Imbriani, 1975; Cho et al., 1997). Alguns fatores desencadeados com a incorporação da matéria orgânica ao substrato são o aumento de fenóis nas raízes, o que pode implicar na resistência de plantas a *Meloidogyne* spp. (Giebel, 1974; Alam et al., 1980), alterações no tamanho, formato e/ou conteúdo das células gigantes podem prejudicar a alimentação dos nematóides (Bird & Kaloshian, 2003; Van Haren et al., 1994, citados por Perry & Gaur, 1996), e reduzir o teor de lipídios das fêmeas desse nematóide.

Os lipídios constituem a principal fonte de reservas de *Meloidogyne* spp. (Barret, 1981), e decréscimo no conteúdo dessas reservas implica em menor movimentação e fecundidade dos

nematóides (Lee & Atkinson 1976; Demeure et al., 1978; Atkinson, 1980; Womersley, 1987; Gibson et al., 1995), e pode prejudicar o desenvolvimento de *P. penetrans*.

Nesse trabalho objetivou-se: a) estudar a influência da concentração de endósporos na suspensão aquosa e do tempo de agitação da suspensão na adesão de *P. penetrans* em *M. javanica*; b) avaliar a produção massal de *P. penetrans* utilizando-se diferentes níveis de inóculo e populações de espécies de *Meloidogyne*, cultivares de tomateiro, idades da planta hospedeira e incorporação de esterco de curral ao substrato; c) observar possíveis modificações no conteúdo de lipídios dos nematóides, fenóis nas raízes do tomateiro e alterações em células gigantes das plantas em consequência da adição de esterco de curral ao substrato.

### Referências bibliográficas

- ALAM, M.M.; M. AHMAD; A.M. KHAN. 1980. Effect of organic amendments on the growth and chemical composition of tomato, eggplant and chilli and their susceptibility to attack by *Meloidogyne incognita*. *Plant and Soil*, 57: 231-236.
- ALVES, F.R.; L.G. FREITAS; V.A. JÚLIO. 2002. Mobilidade de juvenis de *Meloidogyne javanica* em solo com diferentes concentrações de endósporos de *P. penetrans*. *Nematologia Brasileira*, 26(2): 199-204.
- ATKINSON, H.J. 1980. Respiration in nematodes. In: *Nematodes as Biological Models*, Vol. 2 ZUCKERMAN, B, M, (ed). London: Academic Press, p. 101-142.
- BARRET, J. 1981. *Biochemistry of parasitic helminthes*. London, Macmillan Publishers. 308p.
- BIRD, D. McK.; I. KALOSHIAN. 2003. Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 115-123.
- BISHOP, A.H.; D.J. ELLAR. 1991. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* in vitro. *Biocontrol Science and Technology*, 1: 101-114.
- BROWN, M. S.; G.C. SMART, JR. 1985. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology*, 17(2): 123-126.
- CAMPOS, V.P.; J.T. de SOUZA; R.M. SOUZA. 1998. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 6: 285-327.
- 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 inoculation methods, *Meloidogyne* spp. and different host plants for production of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 29(4): 573-574.
- DAVIES, K.G.; V. LAIRD; B.R. KERRY. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Révue de Nématologie*. 14(4): 611-618.

- DEMEURE, Y.; G. REVERSAT; S.D. VAN GUNDY; D.W. FRECKMAN, 1978. The relationship between nematode reserves and their survival to desiccation. *Nematropica*, 8(2): 7-8.
- FERRAZ, S.; M.A. SANTOS. 1995. Controle Biológico de fitonematóides pelo uso de fungos In: Revisão Anual de Patologia de Plantas. 1: 283-314.
- GIANNAKOU, I.O.; B. PEMBROKE; S.R. GOWEN; S. DOULOUMPAKA. 1999. Effects of fluctuating temperatures and different host plants on development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* , 31: 312-318.
- GIANNAKOU, I.O.; B. PEMBROKE; S.R. GOWEN; K.G. DAVIES. 1997. Effects of long term storage and above normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 43: 185-92.
- GIBSON, D.M.; R.A. MOREAL; G.P. McNEIL; B.B. BRODIE. 1995. Lipid composition of cyst stages of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology*, 27(3): 302-311.
- GIEBEL, J. 1974. Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes: A review. *Journal of Nematology*, 6(4): 175-184.
- GOMES, C.B. 2001. Métodos para o aprimoramento da multiplicação de *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr "in vivo". Tese de doutorado, Viçosa, MG, 60p.
- HASS, B.; M.J. DOWNES; C.T. GRIFFIN. 2002. Persistence of four *Heterorhabditis* spp. isolates in soil: Role of lipid reserves. *Journal of Nematology*, 34(2): 151-158.
- LEE, D.L.; H.J. ATKINSON. 1976. *Physiology of nematodes*. 2º edition, 215 p.
- MANKAU, R.; J.L. IMBRIANI. 1975. The life cycle of an endoparasite in some tylenchid nematodes. *Nematologica*, 21: 89-94.
- PERRY, R.N.; H.S. GAUR. 1996. Host plant influences on the hatching of cyst nematodes. *Fundamental And Applied Nematology*, 19(6): 505-510.
- RODRIGUES, A.K.; L.G. FREITAS; A.A. AZEVEDO; S. FERRAZ. 2003. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies vegetais. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3): 267-272.

- SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes: A global menace to crop protection. *Plant Disease*, 64: 36-41.
- SAYRE, R.M.; W.P. WERGIN. 1977. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology*, 129(2): 1091-1101.
- SHARMA, R.D.; G.R. STIRLING. 1991. *In vivo* mass production systems for *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 37: 483-484.
- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant-parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Melksham, Redwood Press. 282p.
- STIRLING, G.R.; M.F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.
- WILLIAMS, A.B.; G.R. STIRLING; A.C. HAYWARD; J. PERRY. 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Applied Bacteriology*, 67: 145-156.
- WOMERSLEY, C. 1987. A re-evaluation of strategies employed by nematode anhydrobiotes in relation to their natural environment: in: VEECH, J.; D.W. DICKSON (eds.). *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville, 165-173.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **Produção de endósporos de *Pasteuria penetrans* em tomateiros de crescimento indeterminado, cv. Santa Clara, versus determinado, cv. TRural I.**

FÁBIO RAMOS ALVES<sup>1,3</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>2</sup>, PAULO ROBERTO PALA MARTINELLI<sup>2</sup>, ANDRÉ HENRIQUE COSTA<sup>2</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Parte da Dissertação de Doutorado em Fitopatologia do 1º autor desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa/UFV, <sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil, <sup>3</sup>e-mail: [fabioramosalves@yahoo.com.br](mailto:fabioramosalves@yahoo.com.br)

**Resumo** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; A.H. Costa & S. Ferraz. Produção de endósporos de *Pasteuria penetrans* entre tomateiros de crescimento indeterminado, cv. Santa Clara, versus determinado, cv. TRural I. **Nematologia Brasileira.**

Por falta de um meio de cultura que permita a reprodução de *Pasteuria penetrans* ‘in vitro’, essa bactéria é multiplicada em *Meloidogyne* spp. parasitando tomateiros. O tomateiro cv. Santa Clara é amplamente utilizado para a multiplicação de inóculo de *Meloidogyne* spp., porém, plantas desse cultivar, devido a seu hábito de crescimento indeterminado, são mais dificilmente mantidas em casa de vegetação que plantas de porte menor. O tomateiro cv. TRural I apresenta hábito de crescimento determinado, boa resistência às pragas e doenças da parte aérea e permite boa multiplicação de *Meloidogyne* spp. Neste estudo, comparou-se a produção massal de *P. penetrans* em raízes de tomateiro cv. Santa Clara e cv. TRural I. Plantas com 15 dias de idade foram inoculadas com 5.000 ou 10.000 juvenis de segundo estágio (J2) com cinco endósporos, em média, aderidos as suas cutículas. Após 50 dias, separou-se a parte

aérea das raízes avaliaram-se os pesos de matéria fresca e seca, e o número de galhas e de endósporos por planta. Maior peso de matéria fresca e seca e número de endósporos foi observado no tomateiro cv. Santa Clara. Maior número de galhas foi observado quando ambos os cultivares foram inoculadas com 10000 J2. Embora o tomateiro cv. Santa Clara tenha permitido maior reprodução da *P. penetrans*, o cv. TRural, devido ao seu porte reduzido e maior resistência às pragas e doenças da parte aérea, pode ser uma opção viável para a multiplicação da *P. penetrans*.

Palavras-chave: *Meloidogyne* spp. *Pasteuria penetrans*, produção massal, cultivares de tomate.

**Summary** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; A.H. Costa & S. Ferraz. *Pasteuria penetrans* endospore rearing in the tomato cv. Santa Clara versus in the dwarf tomato cv. TRural I. **Nematologia Brasileira**.

Tomato cv. Santa Clara is largely used to multiply inoculum of *Meloidogyne* spp., however, these plants, due to their indeterminate growth, are difficult to maintain in greenhouse when compared to smaller plants, with less foliage. Tomato cv. TRural I has determined growth habit, good resistance to foliar pests and diseases and provides a good multiplication of *Meloidogyne* spp. In this study, the mass production of *Pasteuria penetrans* was compared in tomato plants cv. Santa Clara and cv. TRural I. Fifteen day-old plants of both cultivars were inoculated with 5,000 or 10,000 second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* species encumbered with approximately five endospores. After 50 days, fresh and dry root weights, gall and endospore number per plant were determined. Higher fresh and dry root weight and endospore number were observed in the tomato cv. Santa Clara. More galls was

observed in both cultivars when they were inoculated with 10,000 J2. Although the tomato cv. Santa Clara resulted in the production of higher *P. penetrans* endospore number, the cv. TRural, for it's better resistance to pests and diseases of the aerial part, may be a good option for *P. penetrans* multiplication.

**Key-words:** *Meloidogyne*, *Pasteuria penetrans*, mass production, tomato cultivars.

### **Introdução**

Os problemas ambientais e de saúde humana causados pelo uso de nematicidas têm levado pesquisadores em todo o mundo à buscar medidas alternativas para o controle de fitonematóides, como o controle biológico (Stirling, 1991). A bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr, devido a várias características desejáveis que apresenta como agente de biocontrole (Jatala, 1986; Cho et al., 1997, Giannakou et al., 1997; Campos et al., 1998), tem sido pesquisada freqüentemente (Chen & Dickson, 1998). A multiplicação e a manutenção de inóculo dessa bactéria são feitas inoculando-se plantas de hospedeiro suscetível, normalmente tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), com juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. com endósporos de *P. penetrans* aderidos as suas cutículas (Stirling & Wachtel, 1980).

Devido à inviabilidade, até o momento, da multiplicação de *P. penetrans* em meio de cultura, esforços têm sido feitos com o intuito de maximizar a produção dessa bactéria 'in vivo', utilizando-se plantas hospedeiras que permitam maior multiplicação da bactéria e que sejam mais facilmente cultivadas (Rodrigues et al., 2003). Com esse objetivo, Gomes et al (1999) compararam a reprodução de *P. penetrans* em tomate, fumo (*Nicotiana tabacum* L.), camapu (*Physalis angulata* L.), maxixe (*Cucumis anguria* L.) e *Trichogonia* sp., e observaram maior multiplicação da bactéria em tomateiro. Rodrigues et al. (2003), ao estudarem o ciclo de vida de

*P. penetrans* em três espécies botânicas, observaram que o maxixe foi pior hospedeiro para produção de *P. penetrans* que tomateiro e camapu. Sharma & Stirling (1991) testaram a produção de *P. penetrans* em tomateiro, feijão-mungo (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), trigo (*Triticum sativum* Lamarck), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.) , ervilha (*Pisum sativum* L.) cultivados em vasos e bandejas e notaram que o tomateiro permitiu maior multiplicação da bactéria.

Tomateiros de crescimento indeterminado como os cultivares Santa Clara e Rutgers são amplamente utilizados para a multiplicação e manutenção de *Meloidogyne* spp. e *Pasteuria penetrans* em casa de vegetação (Esnard et al., 1997; Cho et al., 1997; Chen et al. 1997; Chen & Dickson, 1997; Chen et al., 2000; Rodrigues et al., 2003). Porém, Pimentel et al. (2003) e Sharma & Stirling (1991) ressaltam que o hábito de crescimento indeterminado dessas plantas dificulta sua manutenção, faz com que a planta ocupe um espaço considerável e sua grande área foliar seja alvo maior para pragas e doenças.

Pimentel et al. (2003) desenvolveram um cultivar de tomateiro de crescimento determinado denominado TRural I e, segundo os autores, a multiplicação de *M. incognita* e *M. javanica* nesse cultivar equiparou-se àquela em tomateiro cv. Rutgers. Esse cultivar parece ser mais resistente às pragas e doenças da parte aérea que freqüentemente ocorrem no tomateiro (Dagoberto Saunders de Oliveira, informação pessoal). Uma das vantagens em se utilizar plantas de crescimento determinado em experimentos em nematologia é o cultivo de mais plantas por unidade de área e irrigações menos freqüentes (Pimentel et al., 2003). Considerando que o tomateiro cv. TRural I permite boa multiplicação de *Meloidogyne* spp., é possível que ele também propicie uma boa reprodução de *P. penetrans* (Hatz & Dickson, 1992). Desta forma, objetivou-se neste trabalho, comparar os cultivares de tomateiro Santa Clara e TRural I quanto a multiplicação de *P. penetrans*.

## Material e métodos

Sementes de tomateiro cv. Santa Clara e TRural I foram semeadas em bandejas contendo substrato organo-mineral (Plantmax®). Após 15 dias, as mudas foram transplantadas para vasos de 4 L de capacidade contendo solo e areia na proporção 1:1 (V:V) e inoculadas com 5.000 ou 10.000 J2 de uma população de espécies *Meloidogyne* (aproximadamente 60% *M. incognita* e 40% *M. javanica*), proveniente de um campo de cultivo de tomate da horta da Universidade Federal de Viçosa-MG. A determinação das espécies de *Meloidogyne* e da porcentagem de cada na população foram feitas por eletroforese de isoenzimas. Ovos das espécies de *Meloidogyne* foram obtidos empregando-se a técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1981). Depois de obtidos, os ovos foram colocados em câmaras de eclosão que foram mantidas a 27 °C até que eclodisse número suficiente de J2 para a inoculação das plantas. Para a obtenção do inóculo de *P. penetrans*, multiplicou-se uma população de diversos isolados da bactéria em população mista de *M. javanica* e *M. incognita* em plantas de tomate cultivadas em casa de vegetação por 90 dias. Após esse período, fêmeas foram retiradas das raízes sob microscópio estereoscópio, transferidas para tubos tipo Eppendorf e esmagadas para a liberação dos endósporos de *P. penetrans*, que foram posteriormente quantificados em câmara de Newbauer. Para promover a adesão desses endósporos aos J2 previamente eclodidos, uma suspensão aquosa de 30 mL contendo 10.000 J2 e  $1 \times 10^6$  endósporos foi colocada por tubo de 50 mL de capacidade, vedado e agitado em agitador orbital a 180 rpm por 30 minutos para a obtenção de média de cinco endósporos aderidos por J2. Logo após, as plantas foram inoculadas através da deposição de suspensão aquosa contendo os J2 em quatro orifícios ao redor das plantas. Cinquenta dias após a inoculação, a parte aérea foi cortada e as raízes lavadas em água corrente e pesadas para determinação do peso da matéria fresca (PMF) e do número de galhas por planta (NG). Posteriormente, as raízes foram secas por 72

horas em estufa de circulação forçada (FABBE-Primar) a 70 °C; determinou-se o peso da matéria seca por planta (PMS) e as raízes secas foram trituradas em moinho (General Electric A-C mot) para obtenção de um pó de raiz (Stirling e Wachtel, 1980). Quantificou-se o número de endósporos (NE) em câmara de Neubauer tomando-se o pó de raiz de cada planta e colocando-o em Erlenmeyer de 200 mL de capacidade. Em seguida, adicionaram-se 100 mL de água para obtenção de uma suspensão de endósporos. Alíquotas da suspensão foram transferidas para câmara de Neubauer e a quantificação de endósporos foi feita seis vezes em microscópio de luz em um aumento de 400x. O experimento teve oito repetições e foi conduzido por duas vezes em casa de vegetação, com dois dias de intervalo entre a primeira e a segunda condução. O experimento teve esquema fatorial 2 x 2 (dois cultivares de tomateiro x dois níveis de inóculo). Para atender às pressuposições da análise de variância, as variáveis NE, PMF e PMS foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ . Os dados da primeira e segunda condução do experimento foram comparados estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, e como não houve diferença entre eles, fez-se uma análise conjunta de dados utilizando-se o programa SAS<sup>®</sup> versão 6.12.

### **Resultados e discussão**

Maiores PMF e PMS ( $p \leq 0,01$ ), assim como NE ( $p \leq 0,05$ ), foram observados no tomateiro cv. Santa Clara em relação ao cv. TRural I (Figuras 1 e 4). O NG foi maior para plantas que receberam 10.000 J2 ( $p \leq 0,01$ ) ou do cv. Santa Clara em relação ao cv. TRural I (Figuras 2 e 3). O maior PMF e PMS das raízes de tomateiro cv. Santa Clara permitiu maior multiplicação dos nematóides e, conseqüentemente, maior reprodução da *P. penetrans*. O parasitismo de *Meloidogyne* spp. em diferentes espécies hospedeiras ou mesmo em diferentes cultivares de uma mesma espécie botânica pode ser variável (Hadisoeganda & Sasser, 1982),

sendo que condições mais favoráveis para desenvolvimento de fêmeas de *Meloidogyne* spp. resulta em maior produção de *P. penetrans* (Hatz & Dickson, 1992).

O tomateiro cv. Santa Clara permitiu aproximadamente o dobro da produção de endósporos em relação ao cv. TRural I (Figura 4). Entretanto, as plantas do cv Trural têm porte reduzido, maior resistência às pragas e doenças da parte aérea e ocupam menos espaço (Pimentel et al., 2003), podendo ser opção viável para a multiplicação de *P. penetrans*. Uma alternativa visando a maximização da produção de *P. penetrans* nesse cultivar seria o cultivo de duas plantas num mesmo vaso.

A obtenção de endósporos de *P. penetrans* 'in vivo' é feita utilizando-se o método de Stirling & Wachtel (1980), no qual plantas de tomateiro são inoculadas com 5.000 J2 de *Meloidogyne* spp. com endósporos da *P. penetrans* aderidos as suas cutículas. Entretanto, uma outra forma de se obter mais endósporos no tomateiro TRural I seria a inoculação dessas plantas com uma quantidade maior de J2 (Stirling & Wachtel , 1980).

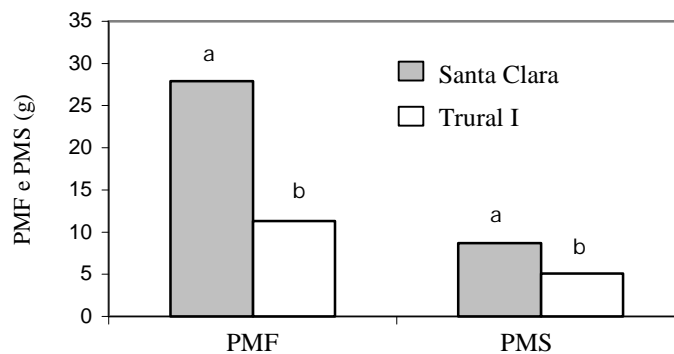


Figura 1. Peso da matéria seca (PMS) e da matéria fresca (PMF) de raízes de tomateiro cv. Santa Clara ou cv. TRural I. As letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste F.

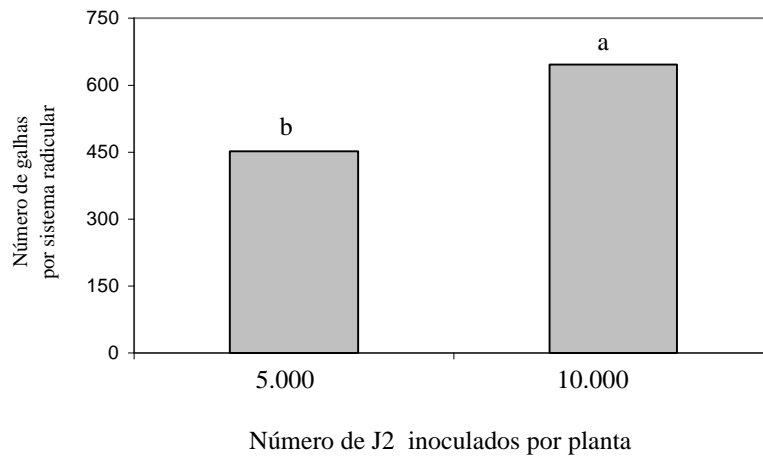


Figura 2. Número de galhas por sistema radicular de tomateiro cv. Santa Clara ou cv. TRural I inoculados com 5.000 ou 10.000 juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de *Meloidogyne*. As letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste F.

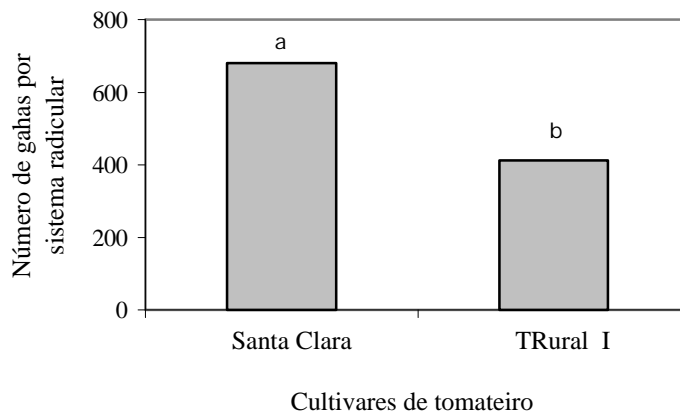


Figura 3. Número de galhas por sistema radicular de tomateiro cv. Santa Clara ou cv. TRural I inoculados com juvenis de segundo estágio de espécies de *Meloidogyne*. As letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste F.

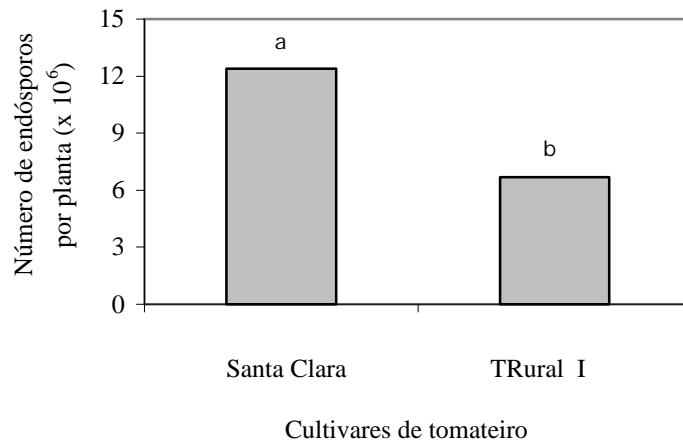


Figura 4. Número de endósporos de *P. penetrans* por sistema radicular de tomateiro cv. Santa Clara ou cv. TRural I inoculadas com juvenis de segundo estágio de espécies de *Meloidogyne*. As letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste F.

#### Referências bibliográficas

- BONETI, J.I.; S. FERRAZ. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Porto Alegre, RS. Fitopatologia Brasileira. Porto Alegre, 6:553.
- CAMPOS, V.P.; J. T. de SOUZA; R.M. SOUZA. 1998. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 6: 285-327.
- CHEN, Z.X.; D.W. DICKSON. 1997. Effect of ammonium nitrate and time of harvest on mass production of *Pasteuria penetrans*. Nematropica, 27(1): 53-59.
- CHEN, Z.X.; D.W. DICKSON. 1998. Review of *Pasteuria penerans*: biology, ecology, and biological control potential. Journal of Nematology, 30(3): 313-340.
- CHEN, Z.X.; D.W. DICKSON; D.J. MITHCHELL; R. McSORLEY; T.E. HEWLETT. 1997. Suppression mechanisms of *Meloidogyne arenaria* race 1 by *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology, 29(1): 1-8.
- CHEN, Z.X.; J. CHARNECKI; J.F. PRESTON & D.W. DICKSON. 2000. Extraction and purification of *Pasteuria* spp. endospores. Journal of Nematology, 32(1): 78-81.
- CHO, M.R.; D.W. DICKSON; T.E. HEWLETT. 1997. Comparison of inoculation methods, *Meloidogyne* spp. and different host plants for production of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology, 29(4): 573-574.
- ESNARD, J.; J.A. McCLURE; D.W. DICKSON; T.E. HEWLETT; B.M. ZUCKERMAN. 1997. Effects of monoclonal antibodies, cationized ferritin, and other organic molecules on adhesion of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 29(4): 556-564.
- GIANNAKOU, I.O.; B. PEMBROKE; S.R. GOWEN; K.G. DAVIES. 1997. Effects of long term storage and above normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Nematologica, 43: 185-92.

- GOMES, C. B.; L. G. FREITAS; L. G. TOME, 1999. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras conduzidas em dois tipos de vasos. In: XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1999, Curitiba, PR. Fitopatologia Brasileira, Suplemento. Fortaleza, CE: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1999. 24: 345.
- HADISOEGANDA, W.W.; J.N. SASSER. 1982. Resistance of tomato, bean, southern pea, and garden pea cultivars to root-knot nematodes based on host suitability. *Plant Disease*, 66: 145-150.
- HATZ, B.; D.W. DICKSON. 1992. Effect of temperature on attachment, development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 24: 512-521.
- JATALA, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 453-89.
- PIMENTEL, J.P.; R.J. NASCIMENTO; R.R. GOULART; L.H. COSTA; M.I.A. GAVAZZA; C.S. SANTOS; R.R.S. NASCIMENTO. 2003. Tomateiro cv. TRural I: Uma nova alternativa para produção e manutenção do inóculo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Uberlândia, MG. Fitopatologia Brasileira, 28 (suplemento), p. 257.
- RODRIGUES, A.K.; L.G. FREITAS; A.A. AZEVEDO; S. FERRAZ. 2003. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies vegetais. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3): 267-272.
- SHARMA, R.D.; G.R. STIRLING. 1991. *In vivo* mass production systems for *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 37: 483-484.
- STIRLING, G.R.; M.F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.

STIRLING, G.R.1991. Biological control of plant-parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Melksham, Redwood Press. 282p.

## 4. CAPÍTULO 2

### **Influência da concentração de endósporos e do tempo de agitação da suspensão na adesão de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne javanica*.**

FÁBIO RAMOS ALVES<sup>1,3</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>2</sup>, PAULO ROBERTO PALA MARTINELLI<sup>2</sup>; ANGÉLICA VIEIRA CAMPOS<sup>2</sup>; ROSÂNGELA D'ARC DE LIMA OLIVEIRA<sup>2</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Parte da Dissertação de Doutorado em Fitopatologia do 1º autor desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa/UFV, <sup>2</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil, <sup>3</sup> e-mail: [fabioramosalves@yahoo.com.br](mailto:fabioramosalves@yahoo.com.br)

**Resumo:** Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; A.V. Campos; R.D.de L. Oliveira & S. Ferraz.. Influência da concentração de endósporos e do tempo de agitação da suspensão na adesão de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira.**

Para a reprodução de *Pasteuria penetrans* é importante que pelo menos três endósporos estejam aderidos à cutícula de cada juvenil, pois a taxa de germinação é de cerca de 30%. Por outro lado, alto número de endósporos aderidos pode reduzir ou impedir a penetração do juvenil na raiz da planta hospedeira. Objetivou-se nesse trabalho determinar a concentração de endósporos na suspensão e o tempo necessário de agitação para se obter adesão de número adequado de endósporos por J2 para a multiplicação da bactéria. Avaliou-se a agitação de suspensão de 10.000 J2 com  $3,3 \times 10^2$ ;  $3,3 \times 10^3$ ;  $3,3 \times 10^4$  ou  $3,3 \times 10^5$  endósporos /mL por 10, 20, 30, 40 e 50 minutos a 180 rpm. Verificou-se que para se obter média de seis endósporos aderidos por J2, suspensões contendo  $3,3 \times 10^5$  ou  $3,3 \times 10^4$  endósporos de *P. penetrans*/mL devem ser agitadas por 10-20 ou 50 minutos, respectivamente. Pelas curvas de adesão geradas

nesse ensaio, conclui-se que aumentar a concentração de endósporos da suspensão é mais eficiente para se aumentar o número de endósporos aderidos por J2 do que aumentar o tempo de agitação com a concentração de endósporos da suspensão constante.

**Palavras chave:** *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne*, adesão.

**Summary** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; A.V. Campos; R.D. de L. Oliveira & S. Ferraz. Influence of endospore concentration and time of agitation of the suspension on the attachment of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne javanica*.

**Nematologia Brasileira.**

To promote the reproduction of *Pasteuria penetrans*, it is important to inoculate plants with nematodes bearing at least three endospores in their cuticles, since the rate of endospores germination is about 30%, however, high numbers of endospores attached per juvenile may reduce or impede its penetration into the roots of the host plants. The objective of this work was to determine the best concentration of endospores in suspension and the time of exposure required to obtain an adhesion suited for the reproduction of this bacterium. The periods of agitation of 10, 20, 30, 40 and 50 minutes with suspension containing 10.000 J2 and  $3,3 \times 10^2$ ,  $3,3 \times 10^3$ ,  $3,3 \times 10^4$  or  $3,3 \times 10^5$  endospores/mL were evaluated. To obtain the average of six endospores per J2, 10 to 20 minutes in suspension with  $3,3 \times 10^5$  endospores/mL or 50 minutes in  $3,3 \times 10^4$  endospores/mL were necessary. According to the regression curves generated in this study, the increment of endospore concentration of the suspension is far more effective for raising the number of endospores attached per J2 than to increase the period of shaking of the endospore suspension at the same concentration.

**Key words:** *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne*, attachment.

## **Introdução**

A bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr é um parasito obrigatório de fitonematóides e apresenta grandes possibilidades de ser usada como nematicida natural (Stirling, 1984, Freitas et al., 2000). Na ausência de meios de cultura que permitam sua multiplicação 'in vitro', o método de produção massal desenvolvido por Stirling & Wachtel (1980) é o mais utilizado para a produção de inóculo dessa bactéria. Nesse método, juvenis de segundo estágio (J2) do nematóide das galhas com endósporos aderidos as suas cutículas são inoculados em plantas de tomate envasadas. Para tal, é fundamental que se utilizem J2 com um número ideal de endósporos de *P. penetrans* em suas cutículas, pois se poucos endósporos estiverem aderidos, há o risco deles não germinarem e, portanto não colonizarem o nematóide, pois segundo Sayre & Wergin (1977) e Stirling (1984), apenas de 20 a 30% dos endósporos aderidos ao nematóide germinam e o colonizam. Por outro lado, a mobilidade dos J2 de *Meloidogyne* spp., assim como a penetração deles nas raízes, são prejudicadas quando estes carregam muitos endósporos (Davies et al., 1991; Alves et al, 2002). Esse fato foi demonstrado por Brown & Smart (1985), que observaram que a adesão de 15 endósporos de *P. penetrans* por J2 reduz a invasão de raízes das plantas hospedeiras em mais de 70%.

Segundo Samaliev (1997), quando se promove a adesão de *P. penetrans* em *Meloidogyne* spp., o número de endósporos aderidos por J2 é resultado da relação entre a concentração de endósporos de *P. penetrans* da suspensão e o tempo de exposição dos nematóides a essa bactéria. Desta forma, objetivou-se nesse trabalho determinar a concentração de *P. penetrans* e o tempo de agitação necessários para que se obtenha um número adequado de endósporos, ou seja, de 6 a 10 endósporos aderidos por J2, para multiplicação da *P. penetrans* 'in vivo'.

## Material e métodos

Agitaram-se suspensões aquosas contendo 10.000 J2 de *M. javanica* (Treb) Chitwood e quatro concentrações de *P. penetrans*, a saber,  $3,3 \times 10^2$ ;  $3,3 \times 10^3$ ;  $3,3 \times 10^4$  ou  $3,3 \times 10^5$  endósporos /mL durante 10, 20, 30, 40 ou 50 minutos. Tubos plásticos de centrífuga de 50 mL de capacidade com tampa, contendo 30 mL de suspensão de nematóides e bactéria foram colocados em agitador orbital e agitados a 180 rpm. O experimento teve quatro repetições sendo que cada tubo constituiu uma repetição. Após decorrido o período de agitação de cada tratamento, os tubos foram transferidos para geladeira a 7 °C para interromper o processo de adesão, como comprovado em testes preliminares (Leandro G. Feitas, comunicação pessoal). O conteúdo de cada tubo foi vertido em placa de Petri e o número de endósporos aderidos por J2 foi determinado nos 30 primeiros J2 observados em microscópio de objetivas invertidas. Regressões lineares foram realizadas com o auxílio do programa SAEG para cada concentração de *P. penetrans*.

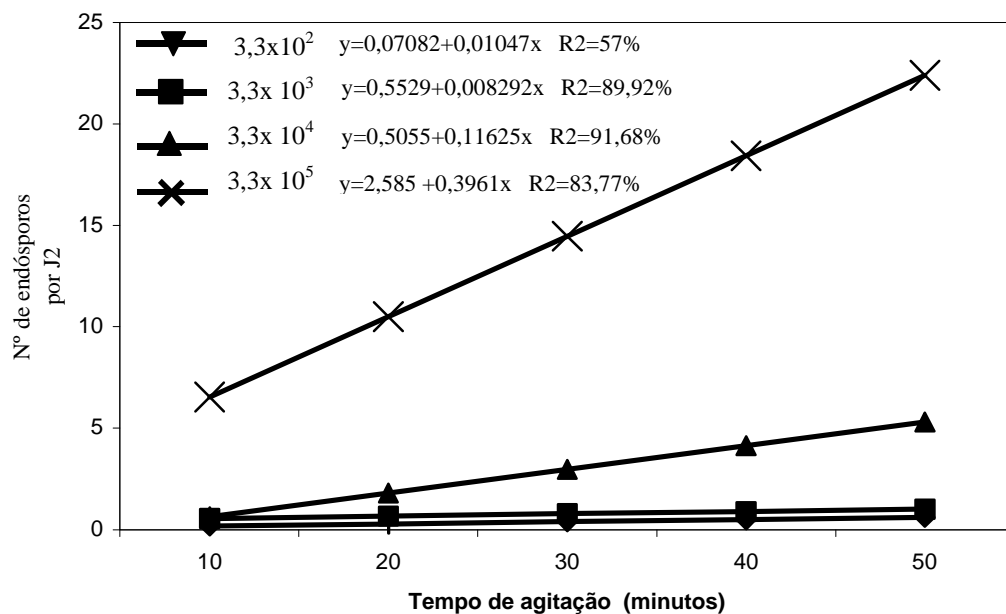
## Resultados e discussão

Para as duas menores concentrações, ou seja,  $3,3 \times 10^2$  e  $3,3 \times 10^3$ , nos diferentes tempos de agitação, foram observados de 0 a 3 endósporos/J2 (Figura 1). A média de seis endósporos por J2 só foi atingida na concentração de  $3,3 \times 10^4$  endósporos/mL após 50 minutos de agitação, entretanto, essa média foi alcançada em apenas 10 minutos em concentração de  $3,3 \times 10^5$  endósporos/mL. Aos 20 minutos, nesta concentração, a média foi de 10 endósporos/J2, o que se considera o limite máximo para a inoculação. Após 50 minutos de agitação, a média foi de 22 endósporos/J2 (Figura 1). Analisando-se os resultados, observa-se que o aumento da concentração de endósporos e tempo de exposição tem um efeito significativo no aumento do

número de endósporos/J2, dados esses que esses que estão em concordância com os obtidos por Samaliev (1997).

Caso o objetivo seja obter maior número de endósporos por J2, o aumento da concentração de *P. penetrans* é mais importante do que o tempo de exposição, uma vez que para as duas menores concentrações, mesmo aumentando o tempo de agitação, praticamente não houve aumento do número de endósporos por J2. Por outro lado, à medida que se aumentou a concentração da bactéria, mais acentuado foi o incremento de endósporos aderidos aos nematóides ao longo do tempo de agitação.

Para que se obtenha de 6 a 10 endósporos aderidos por J2, que é a quantidade ideal de endósporos para condução de experimentos ou multiplicação 'in vivo' de *P. penetrans*, é necessária a concentração de  $3,3 \times 10^4$  endósporos/mL e 50 minutos de agitação, ou  $3,3 \times 10^5$  endósporos/mL e 10 a 15 minutos de agitação, sendo essa última opção mais vantajosa para a produção da *P. penetrans* 'in vivo', quando o número de endósporos para a agitação não é limitante.



**Figura 1.** Influência de cinco tempos de agitação (10, 20, 30, 40 ou 50 minutos) e quatro concentrações de endósporos ( $3,3 \times 10^2$ ;  $3,3 \times 10^3$ ;  $3,3 \times 10^4$  ou  $3,3 \times 10^5$ ) na adesão de *Pasteuria penetrans* em J2 de *Meloidogyne javanica*.

### Referências bibliográficas

- ALVES, F.R.; L.G. FREITAS; V.A. JÚLIO. 2002. Mobilidade de juvenis de *Meloidogyne javanica* em solo com diferentes concentrações de endósporos de *P. penetrans*. *Nematologia Brasileira*, 26(2): 199-204.
- BROWN, M.S.; G.C. SMART, Jr. 1985. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology*, 17(2): 123-126.
- DAVIES, K.G.; V. LAIRD; B.R. KERRY. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Révue de Nématologie*. 14(4): 611-618.
- FREITAS, L.G.; W.S. NEVES; D.N. CARMO; G.S. SILVA. 2000. First case of induction of soil suppressiveness to root-knot nematode by *Pasteuria penetrans* in large areas in the field in Brazil. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Nematologia*, Uberlândia, MG, 129.
- SAMALIEV, H. 1997. Observations on spore attachment of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne* species populations from vineyards in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 3(3): 357-362.
- SAYRE, R.M.; W.P. WERGIN. 1977. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology*, 129(2): 1091-1101.
- STIRLING, G.R.; M.F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.
- STIRLING, G.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, 74(1): 55-60.

## 5. CAPÍTULO 3

### **Utilização de população pura ou mista de espécies de *Meloidogyne* para a produção de *Pasteuria penetrans*.**

FÁBIO RAMOS ALVES<sup>1,3</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>2</sup>, PAULO ROBERTO PALA MARTINELLI<sup>2</sup>; NAYLOR DANIEL DA COSTA AGUIAR<sup>2</sup>; RAQUEL FIALHO RUBIM<sup>2</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Parte da Dissertação de Doutorado em Fitopatologia do 1º autor desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa/UFV. <sup>2</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil. <sup>3</sup> e-mail: [fabioramosalves@yahoo.com.br](mailto:fabioramosalves@yahoo.com.br)

**Resumo** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; N.D. da C. Aguiar; R.F. Rubim & S. Ferraz. Utilização de população pura ou mista de espécies de *Meloidogyne* para a produção de *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira.**

Em nematologia, quando se conduzem experimentos com o objetivo de estudar interações entre *Meloidogyne* spp. e *Pasteuria penetrans*, normalmente utilizam-se juvenis de segundo estágio (J2) dos nematóides para a inoculação das plantas nas quais se pretende multiplicar a bactéria. Esses J2 são obtidos, com frequência, de populações puras de *Meloidogyne* spp. mantidas em casa de vegetação. Porém, é difícil a obtenção de quantidades muito elevadas de J2 a partir dessas plantas devido à limitação de espaço em casa de vegetação. Uma forma alternativa para se conseguir alto número de J2 é a utilização de inóculo proveniente do campo. Porém, nesse caso, a variabilidade da adesão dos endósporos de *P. penetrans* aos nematóides é maior. O objetivo deste trabalho foi comparar a multiplicação de *P. penetrans* em população pura de *M. incognita* ou em população composta de *M. incognita* e *M. javanica*

oriunda de um campo de cultivo de tomate. O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2 (duas populações de nematóides e dois níveis de inóculo dos nematóides, quais sejam, 5.000 ou 10.000 por planta). Maior número de galhas (P 0,01) foi observado quando as plantas foram inoculadas com 10.000 J2. A produção de endósporos de *P. penetrans* em tomateiro inoculado com *M. incognita* foi aproximadamente três vezes superior (P 0,01) àquela em plantas inoculadas com população mista. Realizou-se também um teste de adesão de *P. penetrans* a nematóides das duas populações. Foi observado maior número (P 0,05) de endósporos aderidos aos J2 de *M. incognita* do que aos J2 da população mista, embora a população de *P. penetrans* utilizada parasite ambas as espécies de nematóides. A utilização de inóculo de *Meloidogyne* spp. do campo é uma alternativa viável para a multiplicação da *P. penetrans* quando necessitam-se elevados números de J2, mas populações puras e específicas desse nematóide são mais recomendadas.

**Palavras-chave:** *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne*, produção massal.

**Summary** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; N.D. da C. Aguiar; R.F. Rubim & S. Ferraz. Pure or mixed populations of *Meloidogyne* species for the production of *P. penetrans* in tomato. **Nematologia Brasileira.**

In Nematology, when studies involving relationship between *Meloidogyne* spp. and *Pasteuria penetrans* are conducted, second stage juveniles (J2) are usually used to inoculate the host plants in which the bacteria will grow. These J2 are obtained, mostly, from *Meloidogyne* spp. reared in the greenhouse, but sometimes it is difficult to obtain high numbers of J2 from these plants because of space limitations. One alternative to supplant this problem is to utilize inoculum from the field, where it is common to find high numbers of *Meloidogyne* spp. parasiting susceptible plants, although in this case, there is a high variability in the attachment of

the endospores on the nematodes. The reproduction of *P. penetrans* in pure population of *M. incognita*, and in a mixed population of *M. incognita* and *M. javanica* originating from the field was studied. The experiment was performed on a 2 x 2 factorial design, i.e.; two nematode populations and two nematode inoculum levels (5,000 and 10,000 per plant). Higher numbers of galls ( $P < 0,01$ ) were observed when plants were inoculated with 10,000 J2. The endospore production of *P. penetrans* in tomato plants inoculated with *M. incognita* was approximately three times higher ( $P < 0,01$ ) than in plants inoculated with the field population. An attachment test of *P. penetrans* on the two populations was performed, and higher number ( $P < 0,05$ ) of endospores attached to J2 of *M. incognita* was observed, even being this *P. penetrans* population capable of parasitise the two studied *Meloidogyne* species. The use of *Meloidogyne* spp. from the field to multiply *P. penetrans* is a feasible option when high number of J2 is necessary, but pure and host-specific populations of this nematode are more recommended.

**Key-word:** *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne*, mass production.

## **Introdução**

A bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr, formadora de endósporos, apresenta grande potencial no controle biológico de fitonematóides (Stirling, 1984) devido a sua rusticidade e agressividade e por encontrar-se distribuída em todo o mundo (Chen & Dickson, 1998). Muitos estudos têm sido conduzidos para um melhor entendimento sobre a biologia e ecologia da *P. penetrans*, a fim de torná-la um agente mais eficaz no controle biológico de nematóides (Chen et al., 1997; Chen & Dickson, 1998; Mateille et al., 2002).

Os juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp., ao se locomoverem no solo em busca da raiz hospedeira, entram em contato com endósporos da bactéria que aderem-se

firmemente as suas cutículas e as carregam para o interior da raiz da planta hospedeira onde a bactéria completa seu ciclo de vida (Mankau & Imbriani, 1975). Para propósitos experimentais, a adesão é forçada através de borbulhamento, agitação ou centrifugação da suspensão contendo endósporos da *P. penetrans* e J2 de *Meloidogyne* spp. (Gomes, 2001).

É muito comum em experimentos de nematologia o uso de ovos de *Meloidogyne* spp. para infestação do solo ou inoculação de plantas (Alves & Campos, 2003). Porém quando se pretende estudar interações entre *P. penetrans* e *Meloidogyne* spp., juvenis de segundo estágio (J2) com endósporos aderidos às suas cutículas freqüentemente são usados (Gomes et al., 1999; Rodrigues et al., 2003). Esses J2 normalmente são obtidos de inóculo puro de *Meloidogyne* spp. parasitando plantas hospedeiras cultivadas em casa de vegetação (Alves & Campos, 2003). Entretanto, como o espaço em casa de vegetação normalmente é limitado, a obtenção de elevadas quantidades de J2 para propósitos experimentais ou para multiplicação de grandes quantidades de inóculo de *P. penetrans* pode ser um fator limitante. Uma alternativa para contornar esse problema seria a utilização de inóculo de *Meloidogyne* spp. proveniente de áreas infestadas no campo, onde se encontram plantas com elevadas quantidades de ovos em suas raízes (Bafokuzara, 1983). Porém, quando se utilizam populações mistas de *Meloidogyne* spp., há maior heterogeneidade na adesão dos endósporos de *P. penetrans* aos J2 (Davies et al., 2001). Apesar dessa maior variabilidade, em termos práticos, inóculo de *Meloidogyne* spp. proveniente do campo pode ser de bastante utilidade para multiplicação de grandes quantidades de *P. penetrans*. Porém, nenhum estudo foi feito nesse sentido. Desta forma, objetivou-se nesse trabalho a comparação da produção massal de *P. penetrans* em espécies de *Meloidogyne* originárias do campo com aquela de população pura de casa de vegetação.

## Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Comparou-se duas populações distintas de espécies de *Meloidogyne*, ou seja, uma população pura de *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, mantida em plantas de tomateiro cv. Santa Clara cultivadas em casa de vegetação, e uma população mista (aproximadamente 60% de *M. incognita* e 40% de *M. javanica* (Treub) Chitwood), proveniente de uma área de cultivo de tomate na horta da Universidade Federal de Viçosa-MG, quanto à produção massal de *P. penetrans*. A identificação dos nematóides e a determinação de proporção das espécies foram feitas por eletroforese de isoenzimas. Plântulas de tomateiro cv. Santa Clara, após 15 dias da germinação em bandejas contendo substrato organo-mineral (Plantmax®), foram transplantadas para vasos de 4 L de capacidade. No ato do transplântio, essas plantas foram inoculadas com 5.000 ou 10.000 J2 de uma das populações do nematóide com os endósporos aderidos as suas cutículas. Para a obtenção de inóculo de *P. penetrans*, plantas de tomateiro cv. Santa Clara foram cultivadas em solo infestado com *P. penetrans* e inoculadas com J2 de *M. javanica*. Os nematóides, ao se descolarem no solo em busca da raiz, entraram em contato com a bactéria e a adesão dos endósporos aos nematóides ocorreu de forma natural. Após 70 dias da inoculação, as plantas foram removidas dos vasos e os sistemas radiculares separados da parte aérea. Fêmeas foram retiradas das raízes sob microscópio estereoscópio, transferidas para tubos tipo Eppendorf e maceradas para a obtenção de uma suspensão de endósporos, cuja quantificação foi feita em câmara de Newbauer.

Para obtenção dos J2, ovos foram obtidos a partir do sistema radicular de plantas de tomate empregando-se a técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1981), colocados em câmara de eclosão e mantidos a 27° C. Após a eclosão dos J2, promoveu-se a adesão de endósporos de *P. penetrans* às cutículas dos mesmos. A adesão foi feita colocando-se 30 mL de suspensões aquosas contendo 10.000 J2 e 10<sup>6</sup> endósporos em tubos de

50 mL de capacidade, os quais foram agitados por 30 minutos a 180 rpm em agitador orbital. Finalmente, inocularam-se as plantas com os J2 com até 72 horas de idade.

Cinquenta dias após a inoculação, as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes separadas da parte aérea. As raízes foram lavadas em água corrente, e o peso de matéria fresca por planta (PMF) e o número de galhas por sistema radicular de cada planta (NG) determinados. Posteriormente, essas raízes foram colocadas em estufa de ventilação forçada (FABBE-Primar) a 70° C por 72 horas e, depois de secas, foram pesadas para determinação do peso da matéria seca por planta (PMS) e trituradas em moinho (General Electric A-C mot) para a obtenção do pó de raiz segundo Stirling & Wachtel, (1980). Esse pó foi transferido para frascos tipo Erlenmeyer de 200 mL de capacidade, aos quais adicionaram-se 100 mL de água. A suspensão foi homogeneizada e, dessa suspensão, alíquotas foram coletadas e transferidas para câmara de Neubauer para determinação do número de endósporos por planta (NEP).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com oito repetições em esquema fatorial 2 x 2 (dois níveis de inóculo e duas populações de espécies de *Meloidogyne*). Para atender às pressuposições da análise de variância, as variáveis NEP, PMF e PMS foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ . Os dados foram analisados pelo programa SAS® versão 6.12 e as médias comparadas pelo teste F.

Realizou-se também um teste de adesão de endósporos de *P. penetrans* nas duas populações de *Meloidogyne* spp. mencionadas anteriormente. O inóculo de *P. penetrans* e das espécies de *Meloidogyne* foram obtidos conforme descrição anterior. Suspensões de 30 mL contendo 1.000 J2 de *M. incognita* ou de espécies de *Meloidogyne* e  $1 \times 10^6$  endósporos foram colocadas por tubo de 50 mL e agitadas em agitador orbital por 30 minutos a 180 rpm. Utilizaram-se sete repetições por tratamento sendo que cada tubo constituiu uma repetição. Após a agitação, foi determinado o número de endósporos nos trinta primeiros J2 observados sob

microscópio de objetivas invertidas. Os dados foram analisados pelo programa SAS<sup>®</sup> versão 6.12.

## **Resultados e discussão**

Não houve diferença significativa quanto ao PMF e PMS das raízes inoculadas com inóculo de nematóides do campo ou de casa de vegetação. Maior número de galhas por sistema radicular ( $P = 0,01$ ) foi observado quando as plantas foram inoculadas com 10.000 J2 (Tabela 1). Vários autores relatam que quando plantas são inoculadas com maior número de *Meloidogyne* spp., o número de galhas formado nas raízes é maior (Ritzinger et al., 1997; Chen et al., 1997; Desaegeer & Rao, 2000; Gomes, 2001).

A produção de endósporos, quando se utilizou inóculo de nematóide de casa de vegetação, foi aproximadamente três vezes superior ( $P = 0,01$ ) àquela obtida de plantas inoculadas com inóculo proveniente do campo (Tabela 2), o que pode ser explicada pelo maior número de endósporos ( $P = 0,05$ ) aderidos à cutícula dos J2 de *M. incognita* do que quando se utilizou a população mista do nematóide (Tabela 2). A primeira etapa no controle de *Meloidogyne* spp. por *P. penetrans* é a adesão dos endósporos à cutícula dos J2 (Mankau & Imbriani, 1975). Apesar de os mecanismos relacionados a esse processo ainda não estarem completamente elucidados (Davies et al., 1992), o envolvimento de carboidratos parece influenciar a especificidade da interação entre esses dois organismos (Davies & Danks, 1993). Davis et al. (1988) também relataram que há diferenças estruturais em carboidratos na região anfidial entre populações de *M. incognita* raça 1, raça 3 e *M. javanica*. Porém, essa variabilidade na adesão não parece ser atribuída somente aos carboidratos presentes nos nematóides, mas também à heterogeneidade de proteínas cuticulares entre essas populações de nematóides (Davies et al., 1994; Davies et al., 1996). Davies (2001) e Giannakou et al., (2002) demonstraram que a adesão de um mesmo isolado de *P. penetrans* em diferentes populações de

*Meloidogyne* spp. oriundas de campos de diferentes localidades é variável. Em outro estudo, Davies et al. (1994) observaram maior proporção de endósporos aderidos a populações de nematóides nas quais *P. penetrans* foi originalmente cultivada. Segundo Freitas & Carneiro (2000), essa variabilidade na adesão deve ser considerada quanto ao uso de *P. penetrans* no controle biológico, pois, quanto mais homogênea a adesão de *P. penetrans* no nematóide alvo, maior a porcentagem de J2 infectados e mais promissor será o controle biológico.

A produção de *P. penetrans* foi maior na população de *M. incognita* proveniente de casa de vegetação do que na população oriunda do campo, provavelmente porque as espécies de *Meloidogyne* provenientes do campo apresentam maior variabilidade genética, o que segundo Davies et al., (2001) implica em adesão menor e mais desuniforme aos J2. Entretanto, considerando a dificuldade de se conseguir elevadas quantidades de J2 a partir de inóculo mantido em casa de vegetação, o uso de inóculo do campo pode ser uma alternativa viável, pois, as grandes quantidades de J2 que se pode conseguir no campo, compensaria a menor produção de endósporos em relação à produção da bactéria em inóculo puro de nematóides. Quanto Stirling & Wachtel (1980) propuseram pela primeira vez um método para produzir *P. penetrans* 'in vivo', eles argumentaram que ao invés de se produzir *P. penetrans* em nematóide parasitando plantas em casa de vegetação, poderia inocular-se plantas que tenham valor comercial com *Meloidogyne* spp. e *P. penetrans* no campo, e após a colheita, obter-se-iam as raízes contendo endósporos da bactéria.

Caso se decida utilizar inóculo de *Meloidogyne* spp. do campo para produção de *P. penetrans*, é importante que se colem somente plantas aparentemente saudáveis e se use o método de Hussey & Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz (1981) para a extração dos ovos pois, essa técnica inclui a utilização do NaOH para extração dos ovos e, como esse produto tem efeito bactericida e fungicida, problemas fitossanitários podem ser evitados nas plantas durante a multiplicação da *P. penetrans* e durante a utilização do pó de raiz como inóculo para grandes áreas.

Conclui-se com esse trabalho que o inóculo de *Meloidogyne* spp. do campo pode ser usado para a produção massal de *P. penetrans*, mas que população puras e altamente específicas do nematóide rendem mais endósporos da bactéria.

Tabela 1. Número de galhas por sistema radicular tomateiro cv. Santa Clara inoculado com 5.000 ou 10.000 J2 de espécies de *Meloidogyne*.

Número de galhas por sistema radicular de tomateiro	
5.000 J2	417,5 b
10.000 J2	546,6 a

\* As médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Número de endósporos de *P. penetrans* produzidos por sistema radicular de tomateiro ou aderidos por juvenil de segundo estágio (J2) de espécies de *Meloidogyne* provenientes do campo ou de casa de vegetação.

Fonte de inóculo de nematóide	Nº de endósporos de <i>P. penetrans</i> aderidos por J2	Nº de endósporos de <i>P. penetrans</i> por sistema radicular de tomateiro
Campo	0,9 b	8,8 x 10 <sup>6</sup> b
casa de vegetação	5.8 a	2.9 x 10 <sup>7</sup> a

\* As médias nas colunas seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## Referências bibliográficas

- ALVES, F.R.; V.P. CAMPOS. 2003. Efeitos da temperatura sobre a atividade de fungos no controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 3. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(1): 91-97.
- BAFOKUZARA, N.D. 1983. Influence of six vegetable cultivars on reproduction of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 15(4): 559-564.
- BONETI, J. I. S.; S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1981, Porto Alegre, RS. *Fitopatologia Brasileira*. Porto Alegre: SBF, 6: 553.
- CHEN, Z.X., D.W. DICKSON. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology*, 30(3): 313-340.
- CHEN, Z.X.; D.W. DICKSON; D.J. MITCHELL; R. McSORLEY; T.E. HEWLETT. 1997. Suppression mechanisms of *Meloidogyne arenaria* race 1 by *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 29(1): 1-8.
- DAVIES, K.G.; C. DANKS. 1993. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 39: 53-64.
- DAVIES, K.G.; M. FARGETTE; G. BALLA; A. DAUDI; R. DUPONNOIS; S.R. GOWEN; T. MATEILLE; M.S. PHILLIPS; S. SAWADOGO; C. TRIVINO; E. VOUYOUKALOU; D.L. TRUDGILL. 2001. Cuticle heterogeneity as exhibited by *Pasteuria* spore attachment is not linked to the phylogeny of parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Parasitology*, 122: 111-120.

- DAVIES, K.G.; M. REDDEN; T.K. PEARSON. 1994. Endospore heterogeneity in *Pasteuria penetrans* related to adhesion to plant-parasitic nematodes. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 370-373.
- DAVIES, K.G.; M.P. ROBINSON; V. LAIRD. 1992. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59: 18-23.
- DAVIES, K.G.; P. AFOLABI; P. O'SHEA. 1996. Adhesion of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) inhibited by fibronectin: a study of electrostatic and hydrophobic interactions. *Parasitology*, 112: 553-559.
- DAVIS, E.L.; D.T. KAPLAN; T.A. PERMAR; D.W. DICKSON; D.J. MITHCELL. 1988. Characterization of carbohydrates on the surface of second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*, 20(4): 609-619.
- DESAEGER, J.; M.R. RAO. 2000. Infection and damage potential of *Meloidogyne javanica* on *Sesbania sesban* in different soil types. *Nematology*, 2: 169-178.
- FREITAS, L.G.; R.M.D.G. CARNEIRO. 2000. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* spp. *Controle Biológico*, Jaguariúna, SP, EMBRAPA, 2: 91-125.
- GIANNAKOU, I.O.; S.R. GOWEN; K.G. DAVIES. 2002. Aspects on the attachment of *Pasteuria penetrans* on root-knot nematodes. *Russian Journal of Nematology*, 10(1): 25-31.
- GOMES, C.B. 2001. Métodos para o aprimoramento da multiplicação de *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr "in vivo". Tese de doutorado, Viçosa, MG, UFV. 60p.
- GOMES, C.B.; L.G. FREITAS; L.G.O. TOMÉ. 1999. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras, conduzidas em dois tipos de vasos. *Fitopatologia Brasileira*, 24 (Suplemento): 345-346.
- MANKAU; R.; J. IMBRIANI. 1975. The life cycle of an endoparasite in some Tylenchid nematodes. *Nematologica*, 21: 89-94

- MATEILLE, T.; D.L. TRUDGILL; C. TRIVINO; G. BALA, A. SAWADOGO; E. VOUYOUKALOU. 2002. Multisite survey of soil interactions with infestation of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) by *Pasteuria penetrans*. *Soil Biology & Biochemistry*, 34(10): 1417-1424.
- RITZINGER, C.H.S.P.; R. McSORLEY; R.N. GALLAHER. 1997. Effect of organic amendment placement and inoculum density of *Meloidogyne incognita* on okra seedlings. *Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings*, 56: 28-31.
- RODRIGUES, A.K.; L.G. FREITAS; A.A. AZEVEDO; S. FERRAZ. 2003. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies vegetais. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3): 267-272.
- STIRLING, G.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, 74: 55-60.
- STIRLING, G.R.; M.F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.

## 6. CAPÍTULO 4

### **Influence of inoculum densities of *Meloidogyne* species and host plant age on the mass production of *Pasteuria penetrans*.**

FÁBIO RAMOS ALVES<sup>1,2</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>1</sup>, PAULO ROBERTO PALA MARTINELLI<sup>1</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Phytopathology, Federal University of Viçosa/UFV, Avenida P. H.

Rolfs s/n - Campus, Viçosa, MG, Brazil, cep 36570-000, <sup>2</sup>e-mail :

[fabioramosalves@yahoo.com.br](mailto:fabioramosalves@yahoo.com.br)

**Summary** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli & S. Ferraz. Influence of inoculum densities of *Meloidogyne* species and host plant age on the mass production of *Pasteuria penetrans*.

The mass production of *P. penetrans* in 15, 30, 45 or 60 day-old tomato plants cv. Santa Clara inoculated with 5,000, 15,000 or 25,000 J2 with an average of five endospores per nematode was evaluated. The experiment was conducted in the greenhouse with eight replicates in a completely randomized design, evaluated 50 days after the inoculation, and was repeated once. The fresh root weight, gall number, dry root weight and number of endospore produced per root system were determined. Higher fresh and dry root weights were observed as the age of the plants at the inoculation went from 15 to 60 days old or when they were inoculated with higher concentrations of nematodes. Plants at 15 days old and inoculated with 15,000 or 25,000 J2 presented lower fresh and dry root weight. As the *Meloidogyne* spp. inoculum level went from 5,000 to 25,000 J2, there was an increase in the gall numbers for 30, 45 and 60 day-old

plants, however, a low gall number was observed in the 15 day-old plants inoculated with 25,000 J2. The 30 and 45 day old plants inoculated with 25,000 J2 provided *P. penetrans* multiplication up to nineteen-fold higher than plants inoculated with 5,000 J2 in first experimental run.

**Key-words** – *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne*, mass production, plant age, inoculum density.

**Resumo** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli & S. Ferraz. Influência de densidade de inóculo de espécies de *Meloidogyne* e idade da planta hospedeira na produção massal de *Pasteuria penetrans*.

Comparou-se a produção massal de *P. penetrans* em plantas de tomate cv. Santa Clara com 15, 30, 45 ou 60 dias de idade e inoculadas com 5.000, 15.000 ou 25.000 J2 com cinco endósporos, em média, aderidos por nematóide. O experimento foi conduzido em esquema fatorial (4x3) num delineamento inteiramente casualizado em casa de vegetação com oito repetições e avaliado 50 dias após a inoculação. O experimento foi conduzido duas vezes. Determinou-se o peso da matéria fresca, número de galhas por sistema radicular, peso da matéria seca e número total de endósporos por planta. Maiores pesos de matéria fresca e seca das raízes foram observados à medida que a idade das plantas aumentou de 15 para 60 dias de idade na inoculação ou quando as mesmas foram inoculadas com maior concentração de nematóides. Raízes de plantas com 15 dias de idade e inoculadas com 15.000 ou 25.000 J2 apresentaram menor peso de matéria fresca e seca. À medida que o nível de inóculo do nematóide aumentou de 5.000 para 25.000 J2, houve um aumento no número de galhas em plantas com 30, 45 ou 60 dias de idade, porém, considerável redução no número de galhas foi observado para plantas com 15

dias inoculadas com 25.000 J2. As plantas com 30 e 45 dias de idade inoculadas com 25.000 J2 permitiram multiplicação de *P. penetrans* até 19 vezes superior àquela obtida em plantas inoculadas com 5.000 J2 na primeira condução do experimento.

**Palavras-chave** – *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne*, produção massal, idade de plantas, níveis de inóculo.

### **Introduction**

*Pasteuria* spp. is an endospore-forming bacterium that is obligate parasite of nematodes and is considered one of the most promising agent for the biological control of these pathogens (Stirling, 1984; Chen et al., 1997; Chen & Dickson, 1998; Freitas et al., 2000). Many researchers have tried to cultivate this bacterium 'in vitro' but, no satisfactory growth and sporulation were attained in culture media so far (Williams et al., 1989; Bishop & Ellar, 1991). Stirling & Wachtel (1980) were the first to propose a method to multiply *P. penetrans* (Thorne) Sayre & Starr 'in vivo' by inoculating tomato plants with 5,000 J2 of *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood encumbered with endospores, and after the nematode completed it's life cycle, the roots were washed, dried and ground to generate a powder used as the bacterium inoculum. However, in their publication, these authors suggested that some modifications of their technique could be made to optimize reproduction of this bacterium, such as the use of a more susceptible host plant or the inoculation of the plants with a higher number of nematodes infested with *P. penetrans*. According to Taylor & Sasser (1983), the abundant reproduction of *Meloidogyne* spp. depends on the number of nematode that penetrates the root system. Usually, plants are inoculated with 3,000 to 10,000 eggs or juveniles of nematodes (Canals et al., 1992; Esmenjaud et al., 1995; Fernandez et al., 1995;

McSorley et al., 1995), but if young plants are inoculated with a high number of nematodes, they can be injured to the point that the nematode multiplication is impaired by the death of part of the roots or even the entire plant (Fernandez et al., 1995; Sharma & Fonseca, 2000; Ploegge & Philips, 2001). On the other hand, plants with more developed root system may stand larger quantities of nematode inoculum (Gomes, 2001), in part because they have more available feeding sites (Hashmi et al., 1994). According to Ploegge & Philips (2001), if two weeks old melon plants are inoculated with *M. incognita* severe yield losses are prevented. Rodrigues et al. (2003) evaluated the development of *P. penetrans* in *Meloidogyne* spp. parasitizing different plant species and observed that tomato and camapu (*Physalis angulata* L.), were the best hosts. Stirling & Wachtel (1980) and Gomes (2001) reported that nematode inoculum density is crucial to maximize the multiplication of *P. penetrans*. Hence, the objective of this work was to determine the best balance of tomato plant age and *Meloidogyne* species inoculum level that leads to the production of the maximum number of endospores of *P. penetrans* per root system of tomato plants.

### **Material and methods**

The influence of three inoculum densities of *Meloidogyne* species combined with four ages of tomato plants on the mass production of *P. penetrans* was studied in a 4 x 3 factorial experiment in the greenhouse. Tomato plants at 15, 30, 45, or 60 days old, cultivated in a mixture of soil and sand 1:1 (v:v) in 4 L pots were inoculated with 5,000, 15,000 or 25,000 J2 encumbered with an average of five endospores per nematode.

A population of *Meloidogyne* species composed of approximately 60% of *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood and 40% of *M. javanica*, used in the experiment, was obtained from a field cultivated with tomato in the campus of the

University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The identification of the species and the determination of the percentage of both in the population were done by isozyme electrophoresis. Eggs were extracted from roots using the method described by Hussey & Barker (1973) modified by Boneti & Ferraz (1981), transferred to modified Baermann funnels and incubated at 26° C. The hatched J2 were collected and maintained in water in a beaker flask with air bubbling until the amount required for the inoculation was attained.

*Pasteuria penetrans* was multiplied in *M. incognita* infecting tomato cv. Santa Clara reared in the greenhouse for about 70 days. After this period, the plants were harvested, the females were dissected, transferred to eppendorf tubes and macerated to obtain a suspension of endospores. To promote the attachment of the endospores to the J2, 30 mL of an aqueous suspension containing 10,000 J2 and  $1 \times 10^6$  endospores were added to centrifuge tubes and agitated for 30 min in orbital shaker. Subsequently, the tubes were transferred to refrigerator at 8° C to interrupt the attachment process. Suspension of endospore encumbered J2, up to 96 h of hatched, was calibrated and pipetted in four small holes around the base of each plant, maintained in glasshouse. The pots were randomized every 10 days, and irrigated daily. The experiment was repeated once and each treatment was replicated eight times. The first experimental run was conducted from 16 of February to 8 of April 2004 and the second from 10 of March to 30 of April 2004. Fifty days after inoculation, the plants were harvested and fresh root weight (FRW) and gall number (GN) were determined. Subsequently, roots were oven dried at 70° C for 72 h. The dry root weight (DRW) was determined, and the roots were triturated in a grinder (General Eletrica A-C mot) to obtain a root powder which was transferred to a 250 mL Erlenmeyer flask in which 100 mL of water was added. The suspension was shaken and the endospores number per plant (EN) was determined in Newbauer chamber.

The variables FRW, DRW and EP per plant in the first experimental run and FRW and DRW on the second one were transformed to  $\sqrt{x+0,5}$ . The data were analyzed using the GLM procedure of the SAS program (SAS Institute, version 6.12, Cary, NC).

### **Results and Discussion**

Higher fresh root weight (FRW) and dry root weight (DRW) were observed as the tomato plants were inoculated older (Figure 1) or when nematode inoculum concentration increased from 5,000 to 25,000 J2 in both experimental runs (Figure 2), but there was no interaction between DRW and inoculum concentration in the second run. Plants inoculated at 15 days of age with 15,000 or 25,000 J2 had low DRW and FRW (Figure 3b), because they had their root system damaged by the high number of nematodes invading their roots (Figure 8). The plants inoculated at 30, 45 and 60 days old had more time to develop an abundant root system so they did not suffer the nematode parasitism as much as the youngest ones did (figure 3a and 9). According to Ploege & Philips (2001) and Sharma & Fonseca (2000), young plants can be very injured if they are inoculated with high number of nematodes. Naves & Campos (1993) reported that the root fresh weight was reduced when 15 day-old tomato plants were inoculated with only 3,000 J2 of *Meloidogyne* sp. Schochow et al. (2004) inoculated 5 week-old tomato plants with 0, 100, 1,000 or 10,000 eggs of *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica* and noted an inverse relationship between inoculum density and final population of *M. incognita* and *M. javanica*. When the plants were inoculated with 10,000 nematodes, the authors observed more root damage, loss of available feeding site and lower multiplication rate.

According to the Figures 4 and 5, in both experimental run, that there was an increase in the gall number as the inoculum concentration increased from 5,000 to 25,000 J2 for plants inoculated when they were 30, 45 and 60 days old. However, 15 day-old plants that received 25,000 J2 had their gall number reduced because their roots were severely damaged by the nematodes (Figure 8). Ploegge & Philips (2001), Fernandez et al. (1995), and Sharma & Fonseca (2000) also reported reductions of root system size in young plants due to nematodes parasitism. Plants inoculated at 30 or 45 days of age with 25,000 J2 had the highest number of galls (Figures 4 and 5). Unexpectedly, plants inoculated at 60 days old showed less galls than the ones inoculated at 30 or 45 days old in both experimental runs (Figure 5). Possibly, the oldest plants didn't have a high nematode multiplication because their roots were less attractive to the J2s, which invade only new roots (Sasser & Carter, 1985). In fact, after hatching, the second stage juveniles locate new plant roots through stimuli emanating from the roots of the host plants (Taylor & Sasser, 1983), and invade the region of cell elongation, behind the root cap, being also attracted to apical meristems (Linford, 1939, cited by Sasser & Carter, 1985), due to the large amount of root exudates released, to the high respiration rate (J2 are attracted to high CO<sub>2</sub> concentration) and because the cell walls at those points are thinner and less lignified, allowing easier entry of the nematodes into the roots (Lee & Atkinson, 1976).

In respect to the endospore production, the goal of this study, the results demonstrated that 30 and 45 day-old plants inoculated with 25,000 J2 allowed a higher multiplication of *P. penetrans* in both experimental runs (Figure 6 and 7) which is somehow logic since these plant ages and inoculum concentration resulted in more galls and heavier roots, as mentioned before. Probably these plants, compared to the ones inoculated at 60 days old, were more attractive to nematodes because they still were actively growing and already had an abundance of penetration sites (Hussey, 1985).

When Stirling & Wachtel (1980) developed their classical method of rearing *P. penetrans* in vivo, they inoculated plants with 5,000 J2, but they suggested that if plants were inoculated with higher nematode number the endospore production would be augmented. The hypothesis that crescent densities of *Meloidogyne* spp. imply in higher endospores production was confirmed by Gomes, (2001). However, if young plants are inoculated with high nematode number, their root systems can be injured (Fernandez et al. 1995; Ploege & Philips, 2001) reducing nematode multiplication, and, consequently, *P. penetrans* reproduction (Mankau & Imbriani, 1975).

The fact that the endospore number was higher in the first experimental run than in second was possibly due to a temperature average slightly lower in second run (21,7°C in first experimental run vs. 20,8°C in second experimental run) (Figures 6 and 7). According to Hatz & Dickson (1992), temperature is one of most important factor affecting *P. penetrans* reproduction. The authors related that more endospores of *P. penetrans* was produced as the temperature increased from 20 to 30 °C.

According to the results, nineteen times more endospores can be produced by inoculating 30 to 45 days old tomato plants with 25,000 J2 of *Meloidogyne* species than inoculating 15 day-old plants with only 5,000. Stirling & Wachtel (1980) did not report the age of the plants inoculated with 5,000 J2 of *M. javanica*, but as shown in this study, inoculating older plants with larger amount of encumbered juveniles undoubtedly improves the effectiveness of their method.

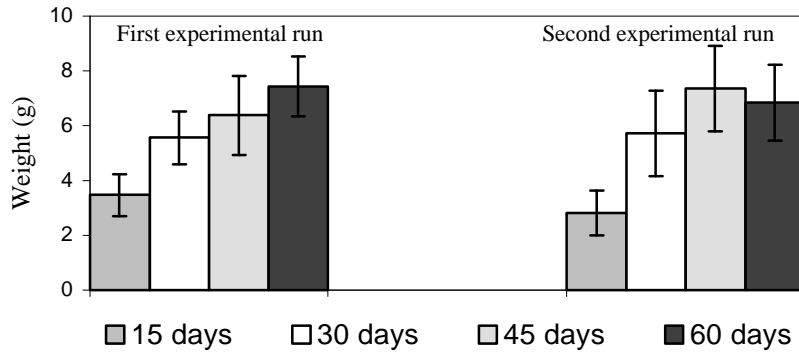


Figure 1. Dry root weight (DRW) per root system of tomato plants inoculated at 15, 30, 45 or 60 days old with second-stage juveniles of *Meloidogyne* species encumbered with *Pasteuria penetrans* endospores. Bars represent confidence interval of means at 5% of probability.

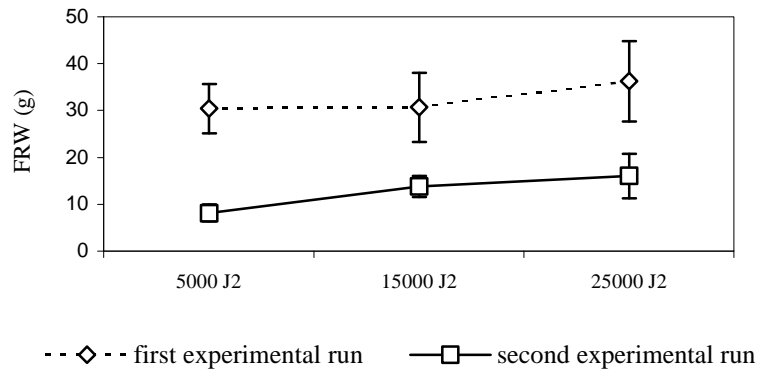


Figure 2. Average of fresh root weight (FRW) of plants inoculated with 5,000, 15,000 or 25,000 second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* species encumbered with *Pasteuria penetrans* endospores. Bars represent confidence interval of means at 5% of probability.

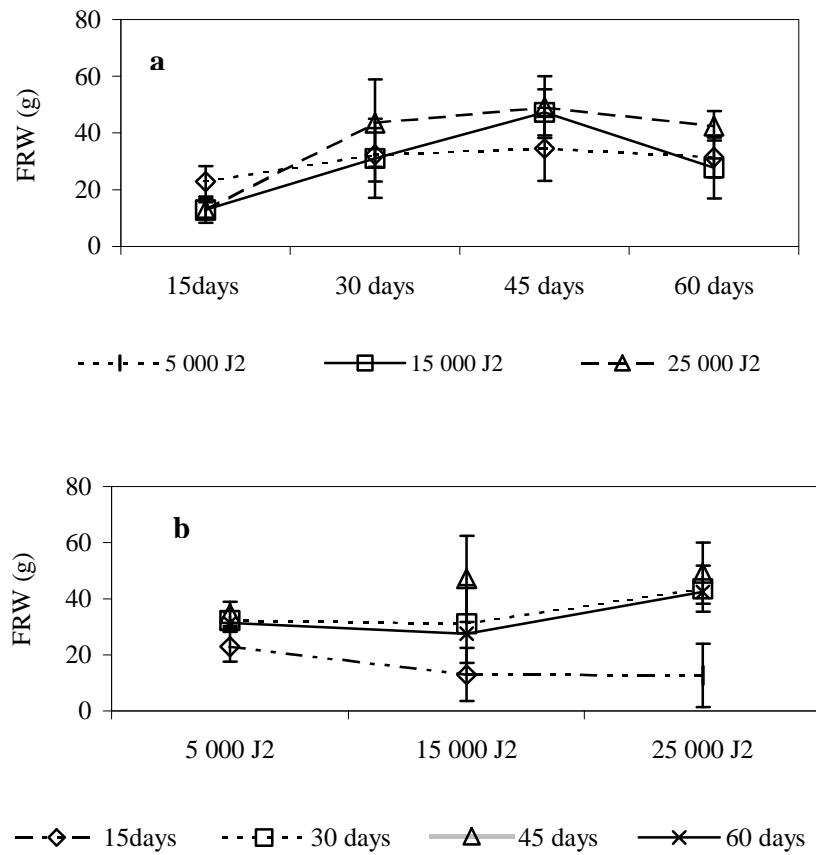


Figure 3. Fresh root weight (FRW) per root system of tomato plants inoculated at 15, 30, 45 or 60 days old with 5,000, 15,000 or 25,000 second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* species encumbered with *Pasteuria penetrans* endospores in the second experimental run. Bars represent confidence interval (CI) of means at 5% of probability.

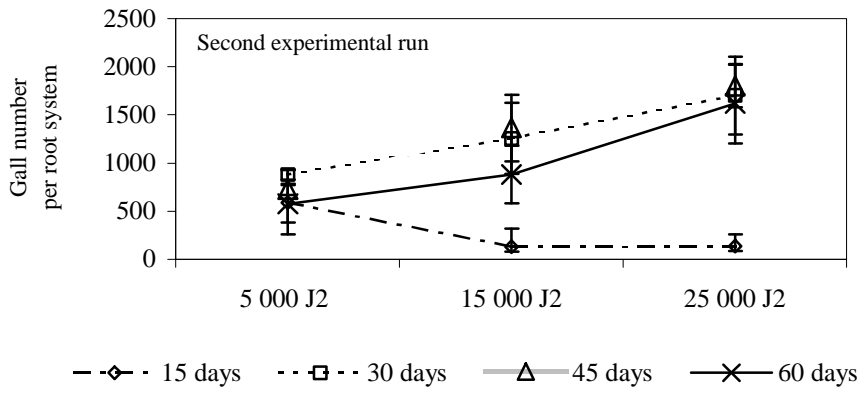
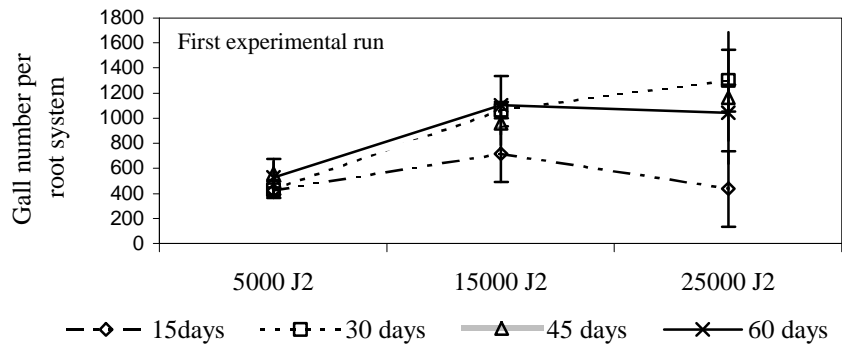


Figure 4. Gall number per root system of tomato plants inoculated at 15, 30, 45 or 60 days old with 5,000, 15,000 or 25,000 second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* species encumbered with *Pasteuria penetrans*. Bars represent confidence interval of means at 5% of probability.

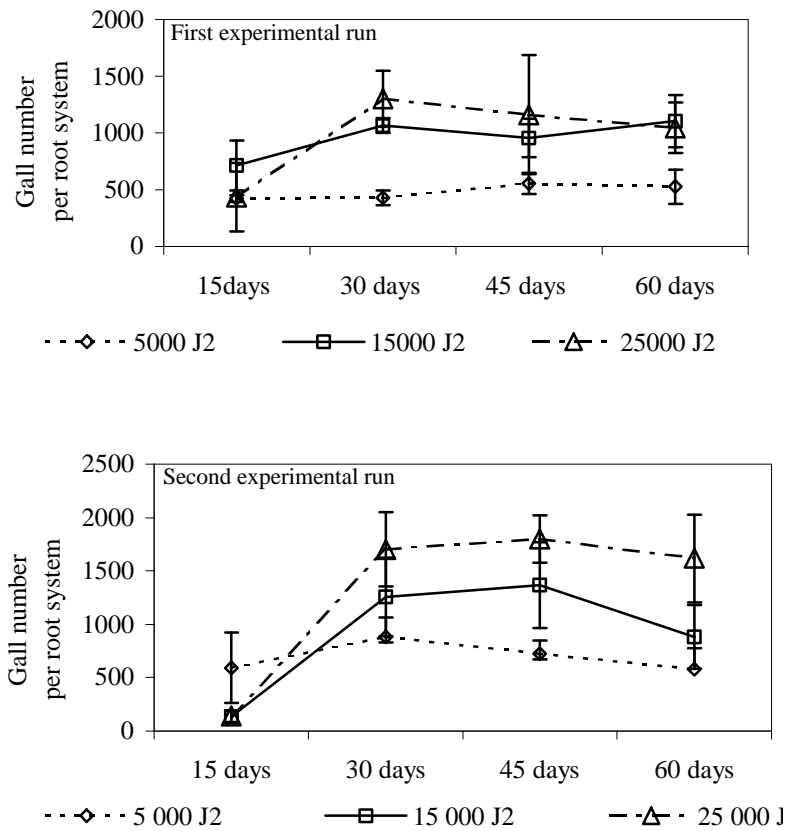


Figure 5. Gall number per root system of tomato plants inoculated at 15, 30, 45 or 60 days old with 5,000, 15,000 or 25,000 second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* species encumbered with *P. penetrans*. Bars represent confidence interval of means at 5% of probability.

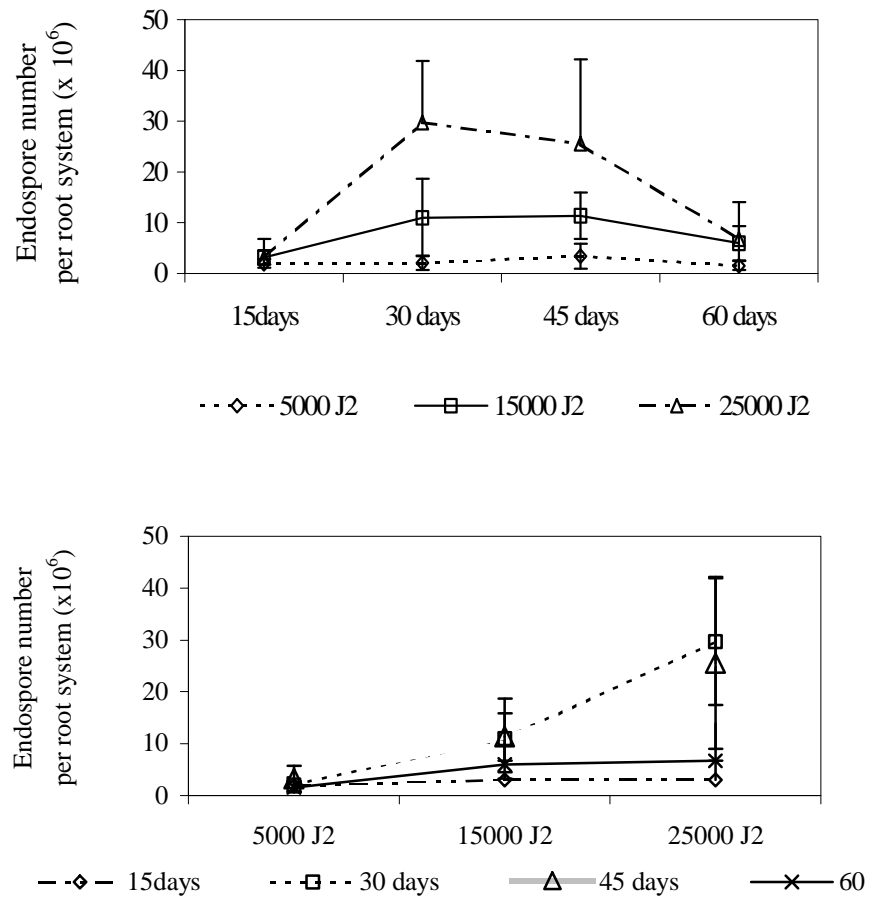


Figure 6. Endospore number of *Pasteuria penetrans* per root system of tomato plants inoculated at 15, 30, 45 or 60 days old with 5,000, 15,000 or 25,000 second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* species encumbered with *P. penetrans* in first experimental run. Bars represent confidence interval of means at 5% of probability.

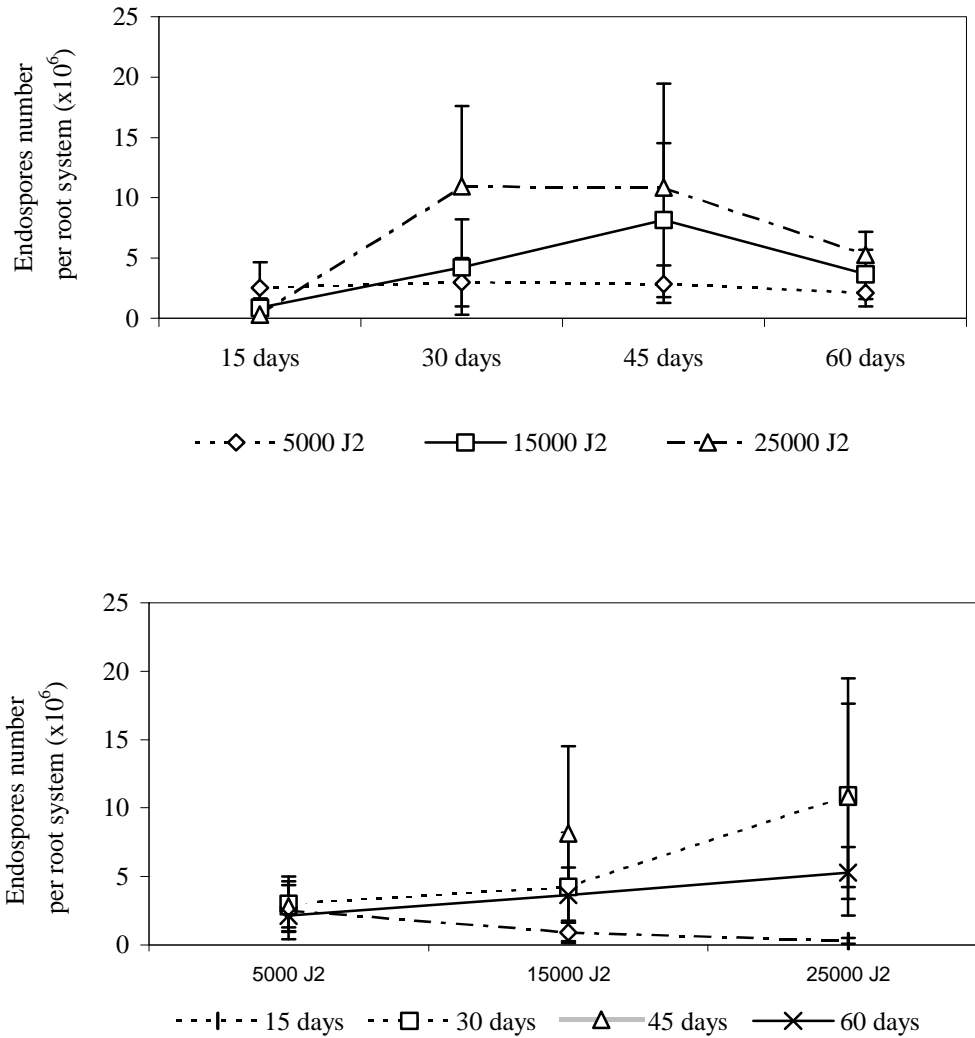


Figure 7. Endospore number of *Pasteuria penetrans* per root system of tomato plants inoculated at 15, 30, 45 or 60 days old with 5,000, 15,000 or 25,000 second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* species encumbered with *P. penetrans* in second experimental run. Bars represent confidence interval of means at 5% of probability.

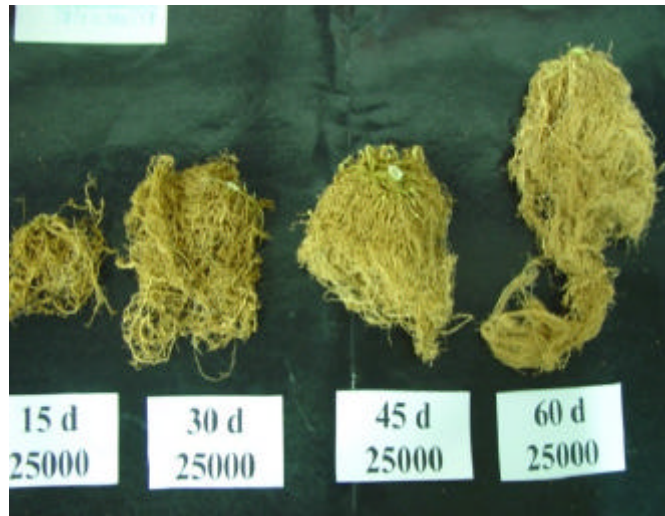


Figure 8. Root systems of tomato plants inoculated at 15, 30, 45 or 60 days old with 25,000 second stage juveniles of *Meloidogyne* species.

## References

- BISHOP, A.H.; D.J. ELLAR. 1991. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* in vitro. *Biocontrol Science and Technology*, 1: 101-114.
- BONETI, J.I.; S. FERRAZ. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Porto Alegre, RS. *Fitopatologia Brasileira*. Porto Alegre, 6: 553.
- CANALS, J.; J. PINOCHET; A. FELIPE. 1992. Temperature and age of plant affect resistance in peach-almond hybrid rootstock infected with *Meloidogyne javanica*. *HortScience*, 27(11): 1211-1213.
- 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; D.J. MITCHELL; R. McSORLEY, T.E. HEWLET, 1997. Suppression mechanisms of *Meloidogyne arenaria* race 1 by *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*. 29(1): 1-8.
- ESMENJAUD, D.; J.C. MINOT; R. VOISIN; G. SALESSES; A. BONNET. 1995. Effect of cutting age on the resistance of *Prunus cerasifera* (*Myrobalan plum*) to *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 27(4): 643-638.
- FERNANDEZ, C.; J. PINOCHET; D. ESMENJAUD; M.J. GRAVATONOBRE; A. FELIPE. 1995. Age of plant material influences resistance of some prunus rootstocks to *Meloidogyne incognita*. *HortScience*, 30(3): 582-585.
- FREITAS, L.G.; W.S. NEVES; D.N. CARMO; G.S. SILVA. 2000. First case of induction of soil suppressiveness to root-knot nematode by *Pasteuria penetrans* in large areas in the field in Brazil. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Nematologia*, Uberlândia, MG, 129.

- GOMES, C.B. 2001. Métodos para o aprimoramento da multiplicação de *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr "in vivo". Tese de doutorado, Viçosa, MG, UFV. 60p.
- HASHMI, G.; R.N. HUETTEL; F.A. HAMME; F.A. HAMMERSCHLAG; L.R. KRUSBERG. 1994. Optimal levels of *Meloidogyne incognita* inoculum for infection of tomato and peach in vitro. *Journal of Nematology*, 26(4): 531-534.
- HATZ, B.; D.W. DICKSON. 1992. Effect of of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 24(4): 512-521.
- HUSSEY, R.S. 1985. Host-parasite relationship and associated physiological changes in: SASSER, J.N.; C.C. CARTER. *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Biology and Control. Vol. I*, 422p.
- LEE, D.L.; H.J. ATKINSON. 1976. *Physiology of nematodes*. Second edition, 215p.
- MANKAU, R.; J.L. IMBRIANI. 1975. The life cycle of an endoparasite in some tylenchid nematodes. *Nematologica*, 21: 89-94.
- McSORLEY, R.; D.W. DICKSON; J.A. de BRITO. 1995. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on sesame varieties. *Soil and crop science society of Florida proceedings*. 54: 58-59.
- NAVES, R.L.; V.P. CAMPOS. 1993. Época de aplicação e testes de isolados de fungos predadores no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. *Nematologia Brasileira*, 17(2): 182-192.
- PLOEGE, A.T.; M.S. PHILIPS. 2001. Damage to melon (*Cucumis melo* L.) cv. Durango by *Meloidogyne incognita* in Southern California. *Nematology*, 3: 151-157.

- RODRIGUES, A.K.; L.G. FREITAS; A.A. AZEVEDO; S. FERRAZ. 2003. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies vegetais. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3): 267-272.
- SASSER, J.N.; C.C. CARTER. 1985. An Advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume I, Biology and Control, Raleigh, North Carolina, 422p.
- SCHOCHOW, M.; S.A. TJOSVOLD, A.T. PLOEG. 2004. Host status of *Lisianthus* 'mariachi lime green' for three species of root-knot nematode. *HortScience*, 39(1): 120-123.
- SHARMA, R.D.; C.E.L. da FONSECA. 2000. Effect of *Meloidogyne javanica* on the growth of pea. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(1): 115-120.
- STIRLING, G.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, 74(1): 55-69.
- STIRLING, G.R.; M.F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.
- TAYLOR, A.L.; J.N. SASSER. 1983. *Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (Especies de Meloidogyne)*. Raleigh, Carolina Del Norte, EUA. 111p.
- WILLIAMS, A.B.; G.R. STIRLING; A.C. HAYWARD; J. PERRY. 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Applied Bacteriology*, 67: 145-156.

## 7. Capítulo 5

### **Influência de esterco de curral e níveis de inóculo de espécies de *Meloidogyne* na concentração de fenóis em raízes de tomateiro, no teor de lipídios dos nematóides e nas células gigantes induzidas por esses patógenos.**

FÁBIO RAMOS ALVES<sup>1,6</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>2</sup>, PAULO ROBERTO PALA MARTINELLI<sup>2</sup>; RENATA MARIA STROZI ALVES MEIRA<sup>3</sup>; ANTÔNIO JACINTO DEMUNER<sup>4</sup>; EDUARDO EUCLYDES DE L. E BORGES<sup>5</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Parte da Dissertação de Doutorado em Fitopatologia do 1º autor desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa/UFV, <sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, <sup>3</sup>Departamento de Biologia Vegetal, <sup>4</sup>Departamento de Química e <sup>5</sup>Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil, <sup>6</sup>e-mail: [fabioramosalves@yahoo.com.br](mailto:fabioramosalves@yahoo.com.br)

**Resumo:** Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; R.M.S.A. Meira; A.J. Demuner; E.E.de L. e Borges & S. Ferraz. Influência de esterco de curral e níveis de inóculo de espécies de *Meloidogyne* na concentração de fenóis em raízes de tomateiro, no teor de lipídios dos nematóides e nas células gigantes induzidas por esses patógenos.

Foi estudada a influência de quatro níveis de esterco de curral no substrato, formando proporções de 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (v:v:v) de solo, areia e esterco, respectivamente, e de três níveis de inóculo de espécies de *Meloidogyne*, ou seja, 3.000, 6.000 ou 9.000 J2/planta, sobre a concentração de fenóis em raízes de tomateiro, sobre teor de lipídios em fêmeas de espécies de *Meloidogyne* e em células gigantes induzidas por esses nematóides. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em um esquema fatorial 4 x 3 (4 substratos e 3 níveis de

inóculo do nematóide). Cinquenta dias após a inoculação, as plantas foram colhidas para as avaliações. A concentração de fenóis nas raízes aumentou à medida que se acrescentou esterco de curral ao substrato ou quando as plantas foram inoculadas com 9.000 nematóides. Não se detectou o efeito dos tratamentos no teor de lipídios dos nematóides. As células gigantes em raízes de plantas cultivadas nos substratos 1:1:0 e 2:2:1 foram mais numerosas. Por outro lado, as células gigantes de plantas cultivadas no substrato 1:1:1 e 1:1:2, além de menos numerosas, apresentaram menor tamanho e número de núcleos, demonstrando o efeito prejudicial de resíduos orgânicos sobre esses sítios de alimentação.

**Palavras-chave:** matéria orgânica, células gigantes, fenóis, lipídios, *Meloidogyne*.

**Summary** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; R.M.S.A. Meira; A.J. Demuner; E.E.de L. e Borges & S. Ferraz. Influence of cattle manure and inoculum levels of *Meloidogyne* species on phenolic contents in the tomato roots, on nematode lipid storage and giant cells induced by these nematodes.

The influence of four levels of cattle manure in mixtures of soil and sand giving rates of 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 and 1:1:2 (v:v:v) of soil, sand and manure, respectively, and three levels of *Meloidogyne* species inoculum, i.e., 3,000, 6,000 and 9,000 J2/plant on the phenols concentration in the tomato roots, nematode lipid contents in females of *Meloidogyne* spp. and in the giant cells induced by the nematodes was studied. The experiment was carried out in the greenhouse in a 3 x 4 factorial design (4 substrates and 3 levels of nematode inoculum) and, 50 days after inoculation, the plants were harvest and evaluated. The phenolic content in the roots increased as higher quantities of manure were used in the substrate or when the plants were inoculated with 9,000 nematodes. No conclusion could be drawn about the effect of the cattle manure on the nematode lipid content. The giant cells in roots of plants cultivated on the

substrates 1:1:0 and 2:2:1 were more numerous. On the other hand, the giant cells of plants cultivated on the substrates 1:1:1 and 1:1:2 were less numerous, smaller and had less nuclei number, demonstrating the deleterious effect of organic amendments to these feeding sites.

**Key-words:** Organic amendments, giant cells, phenols, lipids, *Meloidogyne*.

## **Introdução**

Os nematóides formadores de galhas, *Meloidogyne* spp., são considerados os mais importantes em todo o mundo devido a sua ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros (Sasser, 1980). Entre os fatores que afetam a população de fitonematóides, o emprego de materiais orgânicos merece destaque (Muller & Gooch, 1982; Chen et al., 2000; Nico et al., 2004). A eficiência da matéria orgânica na redução populacional dos nematóides é atribuída a diferentes modos de ação, como o aumento da população de vários organismos antagonistas aos fitonematóides já presentes no solo, como bactérias (Riegel et al., 1996; Chavarria-Carvajal, 2001; Bulluck et al., 2002; Perez et al., 2003), nematóides de vida livre (Akhtar & Mahmood, 1996; Chavarria-Carvajal & Rodriguez-Kabana, 1998; Aktar, 2000; Chavarria et al., 2001; Bulluck et al., 2002; Wang et al., 2003; Kimpinski et al., 2003), fungos (Chavarria-Carvajal et al., 2001), assim como à melhoria das condições físico-químicas do solo (Zavaleta-Mejia et al., 1993; Riegel et al., 1996; McSorley et al., 1997; Chavarria-Carvajal & Rodriguez-Kabana, 1998; Akhtar, 2000), liberação no solo de substâncias tóxicas aos fitonematóides (Riegel et al., 1996; Viaene & Abawi, 1998; Lazarovits et al., 2001; Nico et al., 2004), ou por incorporar antagonistas juntamente a matéria orgânica (Khan & Saxena, 1997; Duponnois et al., 2001). Singh et al. (1983) relataram que plantas crescendo em substrato ao qual se adicionou substrato orgânico adquiriram maior resistência a *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood. Já Sitaramaiah & Singh (1977) afirmam que a atração dos nematóides pelas raízes pode ser

comprometida devido à alteração da composição química dos exsudados após a adição de materiais orgânicos ao substrato.

Entre os compostos produzidos pelas plantas, os fenóis são conhecidos por terem correlação positiva entre sua concentração e o grau de resistência das plantas (Giebel, 1970; Zuckerman 1971; Singh et al., 1983; Valette et al., 1998). Os monofenóis são os mais comumente associados à resistência das plantas a fitopatógenos (Giebel, 1970; Wilski & Giebel, 1972). Giebel (1974) afirma que os compostos fenólicos podem agir como cofatores da peroxidase, que por sua vez induz plantas à resistência. Esse autor relatou que, no caso de nematóides endoparasitas sedentários, os compostos fenólicos estimulam a síntese do AIA-oxidase, favorecendo a decomposição da auxina, o que dificulta ou impede a formação das células gigantes.

O desenvolvimento do nematóide é dependente do metabolismo da planta, e a quantidade de nutrientes disponível no sítio de alimentação determina crescimento e fecundidade desses patógenos. Quanto maior o sítio de alimentação, maior a área de contato com o tecido do hospedeiro e maior a disponibilidade de nutrientes para os nematóides (Van Haren et al., 1994, citados por Perry & Gaur, 1996). Porém, plantas que apresentam algum grau de resistência aos nematóides das galhas apresentam células gigantes com algumas anormalidades se comparadas com células gigantes de plantas suscetíveis (Bleve-Zacheo et al., 1982; Pedrosa et al., 1996; Rodrigues et al., 2003).

Os lipídios constituem a principal fonte de reserva de nematóides (Barret, 1981), sendo que os triacilgliceróis, compõem a maior classe desses lipídios, apresentando, tipicamente, níveis superiores a 70% do lipídio total dos nematóides. Porém, o teor de lipídios totais pode variar de 11 a 67% do peso seco dos nematóides (Barret et al., 1971). Vários autores afirmam que vários fatores bióticos e abióticos podem influenciar o teor de lipídios em fitonematóides (Cooper & Van Gundy, 1970; Jones, 1975; Ogunfowora, 1979; Robinson et al., 1987; Gibson et al., 1995; Hatab & Gaugler, 1997; Riga et al., 2001; Hass et al., 2002;). Supõe-se que fatores que

umentem o teor de fenóis e impedem o desenvolvimento normal das células gigantes acarretam em fêmeas de *Meloidogyne* spp. menores e com menos reservas de nutrientes, entretanto, não há estudos sobre o efeito de materiais orgânicos sobre os níveis de lipídios de *Meloidogyne* spp.

Desta forma, objetivou-se neste trabalho, estudar a influência de esterco de curral adicionado ao substrato no teor de lipídios de *Meloidogyne* spp., nos níveis de fenóis em raízes de tomateiro, e em possíveis alterações nas células gigantes causadas por esses patógenos.

### **Material e Métodos**

Mudas de tomateiro cv. Santa Clara foram produzidas em bandejas contendo substrato orgânico mineral Plantmax® e, após 15 dias da sementeira, foram transferidas para vasos com 4L de capacidade contendo solo, areia e esterco nas proporções 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V), respectivamente, e inoculadas com 3.000, 6.000 ou 9.000 J2 de espécies de *Meloidogyne* (60% *M. incognita* e 40% *M. javanica*). A determinação das espécies de *Meloidogyne* e da porcentagem de cada na população foram feitas por eletroforese de isoenzimas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial 4 x 3 (4 níveis de substratos e 3 níveis de inóculo do nematóide).

Os ovos do nematóide foram obtidos empregando-se a técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1980), e acondicionados em câmaras de eclosão mantida a 26 °C. Os J2 obtidos em uma suspensão aquosa foram colocados em um béquer e mantidos sob borbulhamento de ar. Cinquenta dias após a inoculação, as plantas foram removidas, o sistema radicular separado da parte aérea e avaliado quanto ao teor de lipídios totais nas fêmeas do nematóide, na concentração de fenóis totais nas raízes e quanto a possíveis alterações nas células gigantes provocadas pelo esterco de curral, conforme métodos descritos a seguir.

### **Determinação do teor de lipídios em fêmeas de espécies de *Meloidogyne*.**

Após 50 dias da inoculação, as raízes foram coletadas, lavadas e 30 fêmeas retiradas dessas raízes sob microscópio esterioscópico e transferidas para tubos tipo Eppendorf para a determinação dos lipídios totais. Os tubos foram secos em estufa a 60° C e pesados individualmente, determinando-se assim o peso dos tubos + matéria seca dos nematóides com lipídios (PT + MSNCL). Essa pesagem assim como as demais foram realizadas em balança de precisão. Adicionou-se 1 mL de éter de petróleo aos tubos que foram submetidos a centrifugações a 10.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado o mesmo volume de éter de petróleo e feita nova centrifugação. Esse processo foi repetido quatro vezes. Depois de extraídos os lipídios totais das fêmeas, os tubos foram levados novamente à estufa a 60 ° C por 72 horas e pesados novamente para determinação do peso dos tubos + matéria seca dos nematóides sem lipídios (PT + MSNSL). A porcentagem de lipídios por tratamento foi calculada a partir da diferença entre PT + MSNCL e PT + MSNSL, segundo metodologia de Neves et al., (2002). Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando-se o programa SAS® versão 6.12.

### **Caracterização estrutural das raízes de tomateiro**

Após a extração das fêmeas do nematóide para determinação do teor de lipídios, retiraram-se dez galhas por sistema radicular. Amostras de aproximadamente 0,5 cm dessas galhas foram fixadas em FAA<sub>50</sub> e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Para obtenção de cortes histológicos procedeu-se a inclusão em parafina utilizando-se a série etílico-butílica para a desidratação (Johansen, 1940). Os cortes transversais seriados, de 14 µm de espessura, foram corados com azul de astra e fucsina básica (Gerlach, 1969), por 5 e 20 minutos respectivamente, e as lâminas montadas com resina sintética (bálsamo do Canadá). As observações e as ilustrações foram obtidas em um fotomicroscópio (Olympus BX50) equipado com sistema Optronic engineering DEI. À partir das imagens obtidas, quantificou-se o número de núcleos nas

primeiras trinta células gigantes de cada tratamento. Determinou-se também a área das células gigantes em noventa células de cada tratamento, que foram previamente desenhadas, as imagens digitalizadas e a área determinada a partir do software Quant 1.0.1 (Vale et al., 2001).

### **Determinação do teor de fenóis em raízes de tomateiro**

A análise fotoquímica foi feita através de espectrofotométrico no Departamento de Química da UFV.

Para a obtenção do material para extração do tanino (fenóis totais), as plantas de tomateiro, depois de retiradas as fêmeas para extração de lipídios e galhas para caracterização estrutural das raízes, tiveram suas raízes secas em estufa com ventilação forçada a 70° C por 72 h. As raízes secas foram trituradas e coletaram-se 100 g do pó de raiz que foram submetidos a três extrações consecutivas com metanol (3 mL) a quente (65-75° C), com duração de dez minutos. Os extratos resultantes foram pipetados e filtrados em algodão, no balão volumétrico, e o volume completado para 10 mL, com metanol (Mueller-Hervey, 2001).

Para a preparação da curva padrão, foram adicionados em balão volumétrico de 10 mL, solução padrão de ácido tânico (0,012; 0,024; 0,036; 0,048 e 0,06), 7,5 mL de água destilada, 0,5 mL do reagente Folin-Denis e 1,0 mL de solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, diluindo-se para 10 mL com água. Misturou-se bem e foi determinada a absorvância, depois de 30 minutos, em 760 nm, obtendo-se a curva padrão com absorvância em função de mg de ácido tânico/100 mL.

As leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro de duplo feixe Hitachi U-2000, sendo realizadas três leituras por amostra. Na preparação da amostra para leitura de absorvância, foi pipetado 0,5 mL do extrato em balão volumétrico de 10 mL, ao qual foram adicionados 7,5 mL de água destilada, 0,5 mL do reagente Folin –Denis e 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo completado o volume de 10 mL com água destilada. Após adição dos reagentes, esperou-se 30 minutos para leitura de abosorvância em 760 nm. Depois de determinada, de acordo com a curva padrão, as concentrações das amostras em mg de ácido

tânico/100 mL foram convertidas em porcentagem de tanino por 100 mg de amostra de plantas desidratadas (Mueller-Hervey, 2001), unidade esta utilizada no cálculo da análise de variância. Foram utilizadas três repetições por tratamento e os dados analisados utilizando-se o programa SAS<sup>®</sup> versão 6.12.

## **Resultados e discussão**

À medida que a proporção de matéria orgânica no substrato aumentou, observou-se aumento nas concentrações de fenóis, até um aumento de cerca de 130% (Figura 1). Esses dados estão em de acordo com aqueles encontrados por Alam et al. (1980), que estudaram a composição química em raízes de plantas de tomate, pimenta malagueta e berinjela cultivadas em substrato ao qual se adicionaram tortas ou resíduos de mahua (*Madhuca indica* Gmel), mamona (*Ricinus communis* L.), nim (*Azadirachta indica* Juss.), mostarda (*Brassica campestris* L.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.), O aumento de fenóis totais em tomate, em relação à testemunha, aumentou em até 151,85%. No presente trabalho, o nível de fenóis nas raízes também aumentou quando as plantas foram inoculadas com 9.000 J2 (Figura 2). Espstein (1972) observou que a quantidade de fenóis em raízes de *Bidens tripartida* L. e *Vitis vinifera* L. infectadas por *Longidorus africanus* diferiu quantitativa e qualitativamente e que o nível de fenóis foi mais que duas vezes superior em plantas infectadas pelos nematóides.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, nenhuma inferência pode ser feita quanto a influência do nível de esterco de curral sobre lipídios de fêmeas de espécies *Meloidogyne*. Utilizou-se nesse estudo um método indireto para determinação dos lipídios, que era o único método disponível para a execução deste trabalho, porém, observou-se muita variação dos dados. Possivelmente, a utilização de outros métodos, como sistema de análise de imagem (Fitters et al., 1997), sejam mais precisos e indicados para a determinação de lipídios em nematóides.

Alguns autores relatam que plantas que apresentam algum nível de resistência a *Meloidogyne* spp. apresentam células gigantes com algumas anormalidades em relação à células gigantes normais, como vacúolos menores, menor desenvolvimento, menor número de núcleos, escurecimento do citoplasma e depósito de calose em células adjacentes aquelas invadidas pelos nematóides (Bleve-Zacheo et al., 1982; Pedrosa et al., 1996; Rodrigues et al., 2003), o que está em concordância com observações feitas nesse estudo. As células gigantes de plantas cultivadas nos substratos 1:1:0 e 2:2:1 foram mais abundantes e sem nenhum comprometimento em seus formatos (Figura 5). Esses sítios de alimentação nas plantas cultivadas em substrato com mais esterco foram menores (Figura 4), menos numerosos, deformados e com paredes mais espessas (Figura 5). Outros autores também relataram que houve má formação de células gigantes em plantas resistentes ou más hospedeiras de *Meloidogyne* spp. (Bleve-Zacheo et al., 1982; Pedrosa et al., 1996; Rodrigues et al., 2003). Além disso, o número de núcleos foi menor nas células gigantes de plantas cultivadas nos substratos que receberam mais esterco, caindo de 10 para 6, em média, à medida que o substrato continha maior proporção de esterco (Figura 3).

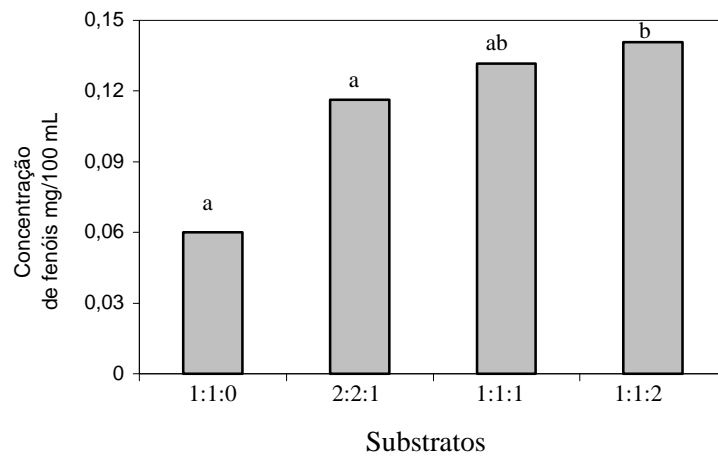


Figura 1. Concentração de fenóis em raízes de tomateiro cv. Santa Clara inoculado com juvenis de segundo estágio de espécies de *Meloidogyne* e cultivado em solo, areia e esterco de gado nas proporções de 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

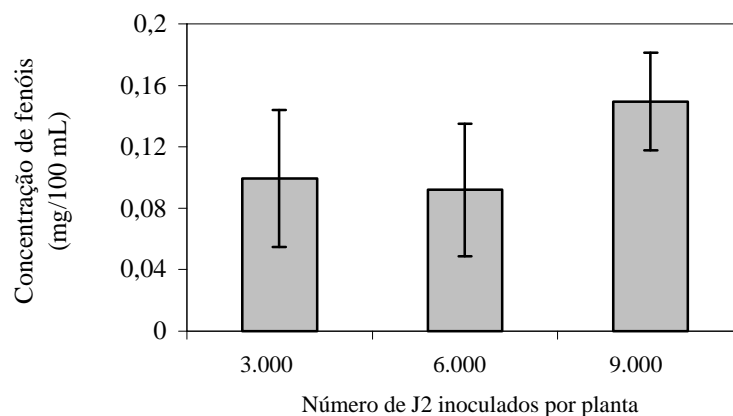


Figura 2. Concentração de fenóis em raízes de tomateiro cv. Santa Clara inoculado com 3.000, 6.000 ou 9.000 juvenis de segundo estágio de espécies de *Meloidogyne*. As barras nas colunas representam o intervalo de confiança ao nível de 5% de probabilidade.

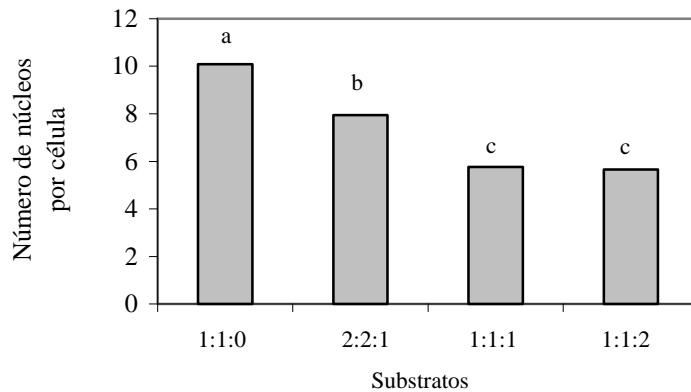


Figura 3. Número de núcleos por célula gigante em raízes de tomateiro cultivado nos substratos solo, areia e esterco nas proporções 1:1:0; 2:2:1; 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V), respectivamente, e inoculado com juvenis segundo estágio de espécies de *Meloidogyne*. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

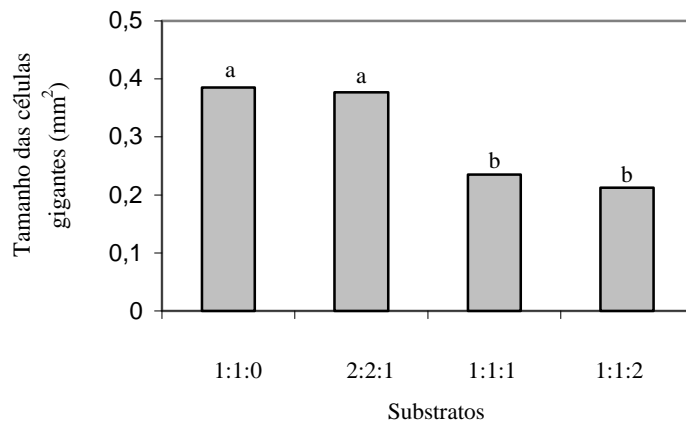


Figura 4. Tamanho das células gigantes de raízes de tomateiro cultivado nos substratos solo, areia e esterco nas proporções 1:1:0; 2:2:1; 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V), respectivamente, e inoculado com juvenis de segundo estágio de espécies de *Meloidogyne*. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

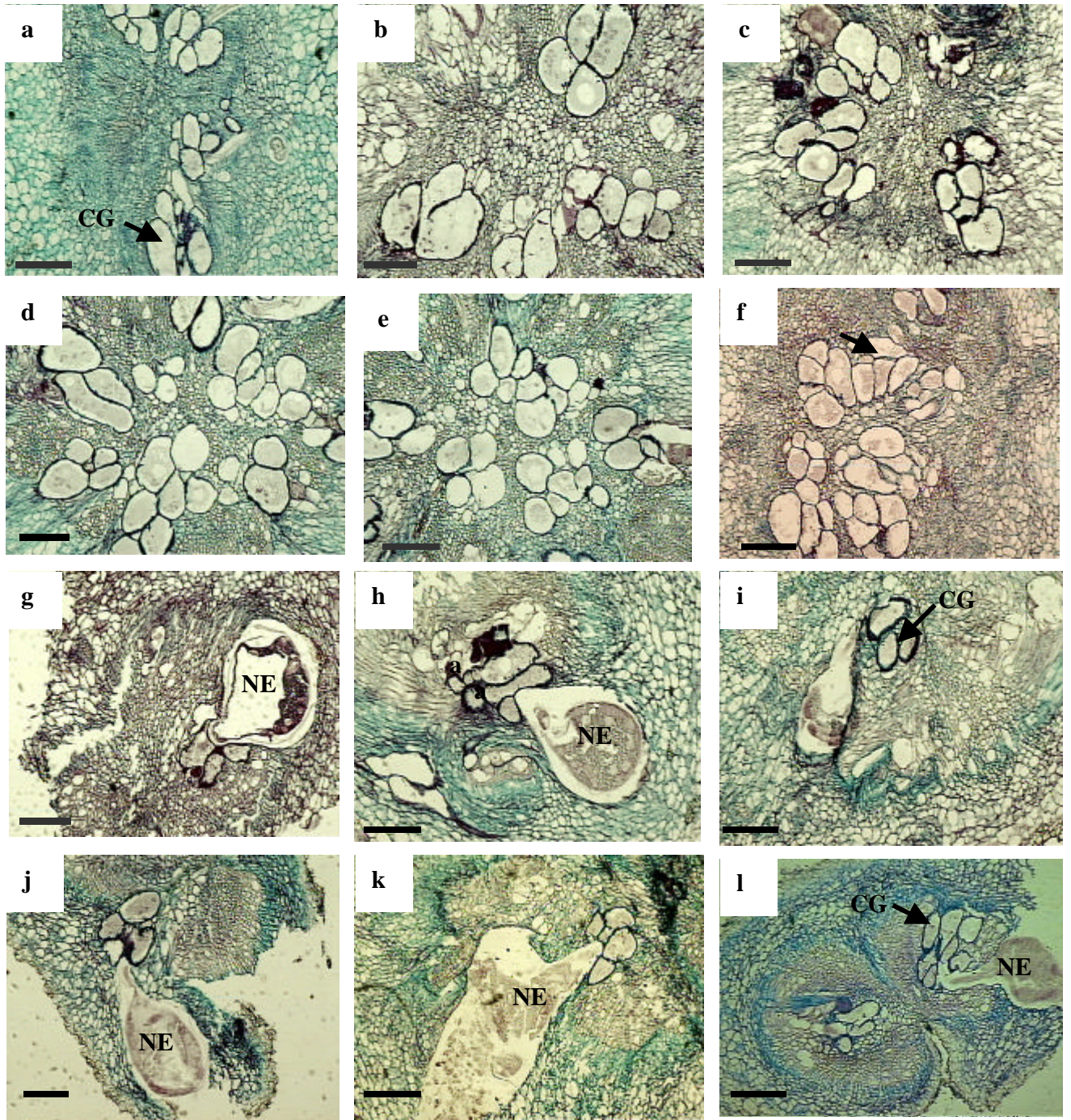


Figura 5. Cortes transversais de galhas de raízes de tomateiro cv. Santa Clara parasitadas por *Meloidogyne* spp. Células gigantes bem desenvolvidas em raízes de plantas cultivadas em substrato 1:1:0 (a-c) e 2:2:1 (d-f). Células gigantes menores, em menor número e deformadas, presentes em raízes de plantas cultivadas em substrato 1:1:1 (g-i) e 1:1:2 (j-l). CG = Células gigantes, NE = nematóides. Barras = 100  $\mu$ m.

## Referências bibliográficas

- AKHTAR, M. 2000. Effect of organic and urea amendments in soil on nematode communities and plant growth. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4): 573-575.
- AKHTAR, M.; I. MAHMOOD. 1996. Control of plant-parasitic nematodes with organic and inorganic amendments in agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 4(3): 243-247.
- ALAM, M.M.; M. AHMAD; A.M. KHAN.1980. Effect of organic amendments on the growth and chemical composition of tomato, eggplant and chilli and their susceptibility to attack by *Meloidogyne incognita*. *Plant and Soil*, 57: 231-236.
- BARRET, J. 1981. *Biochemistry of parasitic helminthes*. London, Macmillan Publishers. 308p.
- BARRET, J.; C.W. WARD; D. FAIRBAIM. 1971. Lipid metabolism in free-living nematodes *Panagrellus redivivus* and *Turbatrix aceti*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 38B, 279-284.
- BLEVE-ZACHEO, T.; G. ZACHEO; M.T. MELILLO; F. LAMBERTI. 1982. Ultrastructural aspects of the hypersensitive reaction tomato root cells resistant to *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterrânea*, 10: 81-90.
- BONETI, J.I.S.; S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1981, Porto Alegre, RS. *Fitopatologia Brasileira*. Porto Alegre: SBF, 6: 553.
- BULLUCK, L.R.; K.R. BARKER, J.B. RISTAINO. 2002. Influences of organic and synthetic soil fertility amendments on nematode trophic groups and community dynamics under tomatoes. *Applied Soil Ecology*, 21(3): 233-250.
- CHAVARRIA-CARVAJAL, J.A.; R. RODRIGUEZ-KABANA. 1998. Changes in soil enzymatic activity and control of *Meloidogyne incognita* using four organic amendments. *Nematropica*, 28(1): 7-18.

- CHAVARRIA-CARVAJAL, J.A.; R. RODRIGUEZ-KABANA; J.W. KLOEPPER; G. MORGAN-JONES. 2001. Changes in populations of microorganisms associated with organic amendments and benzaldehyde to control plant-parasitic nematodes. *Nematropica*, 31(2): 165-180.
- CHEN, J.; G.S. ABAWI; B.M. ZUCKERMAN, 2000. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. *Journal of Nematology*, 32(1): 70-77.
- COOPER, A.F.; S.D. VAN GUNDY. 1970. Metabolism of glycogen and neutral lipid by *Aphelenchus avenae* and *Caenorhabditis* sp. in aerobic, micro aerobic and anaerobic environments. *Journal of Nematology*, 2(4): 305-315.
- DUPONNOIS, R.; J.L. CHOTTE; S.S.P. CADET, 2001. The effects of organic amendments on the interactions between a nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* and the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* parasitizing tomato plants. *Biology and Fertility of Soils*, 34(1): 1-6.
- EPSTEIN, E. 1972. Biochemical changes in terminal root galls caused by an ectoparasitic nematode, *Longidorus africanus*: Phenol, carbohydrates and cytokinins. *Journal of Nematology*, 4(4): 246-250.
- FITTERS, P.F.; E.M. MEIJER; D.J. WRIGHT; C.T. GRIFFIN. 1997. Estimation of lipid reserves in unstained living and dead nematodes by image analysis. *Journal of Nematology*, 29(2): 160-167.
- GERLACH. 1969. *Botanische mikrotechnik, eine einfuehrung*. Georg thieme, Stuttgart.
- GIBSON, D.M.; R.A. MOREAL; G.P. cNEIL; B.B. ODIE. 1995. Lipid composition of cyst stages of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology*, 27(3): 302-311.

- GIEBEL, J. 1970. Phenolic content in roots of some solanaceae and its influence on IAA-oxidase activity as an indicator of resistance to *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 16: 22-32.
- GIEBEL, J. 1974. Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes: A review. *Journal of Nematology*, 6(4): 175-184.
- HASS, B.; M.J. DOWNES; C.T. GRIFFIN. 2002. Persistence of four *Heterorhabditis* spp. isolates in soil: Role of lipid reserves. *Journal of Nematology*, 34(2): 151-158.
- HATAB, M.A.A.; R. GAUGLER. 1997. Influence of growth temperature on fatty acids and phospholipids of *Steirnerinema riobravis* infective juveniles. *Journal of Thermal Biology*, 22(4-5): 237-244.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co., 523p.
- JONES, F.G.W. 1975. The soil as an environment for plant parasitic nematodes. *Annals of Applied Biology*, 79: 113-119.
- KHAN, T.A.; S.K. SAXENA. 1997. Integrated management of root knot nematode *Meloidogyne javanica* infecting tomato using organic materials and *Paecilomyces lilacinus*. *Bioresource Technology*, 61(3): 247-250.
- KIMPINSKI, J.; C.E. GALLANT; R. HENRY; J.A. MACLEOD; J.B. SANDERSON; A.V. STURZ. 2003. Effect of compost and manure soil amendments on nematodes and on yields of potato and barley: A 7-year study. *Journal of Nematology*, 35(3): 289-293.
- LAZAROVITS, G.; M. TENUTA; K.L. CONN. 2001. Organic amendments as a disease control strategy for soil borne diseases of high-value agricultural crops. *Australasian Plant Pathology*, 30(2): 111-117.
- McSORLEY, R.; P.A. STANSLY; J.W. NOLING; T.A. OBREZA; J.M. CONNER. 1997. Impact of organic soil amendments and fumigation on plant-parasitic nematodes in a southwest Florida vegetable field. *Nematropica*, 27(2): 181-189.

- MULLER, R.; P.S. GOOCH. 1982. Organic amendments in nematode control. An examination of the literature. *Nematologica*, 12(2): 319-326.
- MUELLER-HERVEY, I. 2001. Analysis of hydrolyzable tannins. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 3-20.
- NEVES, A.R.; QUEIROZ, A.C.; SILVA, D.J. 2002. Análise de alimentos – métodos químicos e biológicos. 3ª ed., Viçosa, UFV. 235p.
- NICO, A.I.; R.M. JIMENEZ-DIAZ; P. CASTILLO. 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Protection*, 23(7): 581-587.
- OGUNFOWORA, A.O. 1979. Factors affecting emergence, survival and infectivity of *Meloidogyne naasi*. *Nematologica*, 24(1): 72-80.
- PEDROSA, E.M.R.; R.S. HUSSEY; H.R. BOERMA. 1996. Cellular responses of resistant and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. *Journal of Nematology*, 28(2): 225-232.
- PEREZ, M.P.; J.A. NAVAS-CORTES; M.J. PASCUAL-VILLALOBOS; P. CASTILLO. 2003. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. *Plant Pathology*, 52(3): 395-401.
- PERRY, R.N.; H.S. GAUR. 1996. Host plant influences on the hatching of cyst nematodes. *Fundamental And Applied Nematology*, 19(6): 505-510.
- RIEGEL, C.; F.A. FERNANDEZ; J.P. NOE. 1996. *Meloidogyne incognita* infested soil amended with chicken litter. *Journal of Nematology*, 28(3): 369-378.
- RIGA, E.; T. WELACKY; J. POTTER; T. ANDERSON; E. TOPP; A. TENUTA. 2001. The impact of plant residues on the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Canadian Journal of Pathology*, 23: 168-173.
- ROBINSON, M.P.; H.J. ATKINSON; R.N. PERRY. 1987. The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of

- the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue de Nematologie*, 10(3): 343-348.
- RODRIGUES, A.K.; L.G. FREITAS; A.A. AZEVEDO; S. FERRAZ. 2003. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies vegetais. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3): 267-272.
- SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes: A global menace to crop protection. *Plant Disease*, 64: 36-41.
- SINGH, S.P.; V. PANT; A.M. KHAN; S.K. SAXENA. 1983. Attractiveness of *Meloidogyne incognita* larvae to roots of tomato and changes in biochemical content of plants as affected by oilcakes and nematicides. *Nematologia Mediterrânea*, 11: 119-123.
- SITARAMAIAH, K.; R.S. SINGH. 1977. Response of plant parasitic and soil nematodes to extracts of amended soils. *Pantnagar Journal of Research*, 2(3): 153-157.
- STARR, J.L. 1993. Dynamics of the nuclear complement of giant cells induced by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 25(3): 416-421.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R.; ZAMBOLIM, L. 2001. Quant – a software to quantify plant disease severity In: VIII International workshop on plant disease epidemiology, Ouro Preto – MG. International workshop on plant disease epidemiology, 8., Ouro Preto: International Society of Plant Pathology, 2001. 160p.
- VALETTE, C.; C. ANDARY; J.P. GEIGER; J.L. SARAH; M. NICOLE. 1998. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Phytopatology*, 88(11): 1141-1148.
- VIAENE, N.M.; G.S. ABAWI. 1998. Management of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as a cover crop. *Plant Disease*, 82(8): 945-952.
- WANG, K.H.; R. McSORLEY; R.N. GALLAHER. 2003. Effect of *Crotalaria juncea* amendment on nematode communities in soil with different agricultural histories. *Journal of Nematology*, 35(3): 294-301.

- WILSKI, A.; J. GIEBEL. 1972. Phenolics in potato roots and their influence on susceptible-resistant reactions to *Heterodera rostochiensis*. Bulletin del academie polonaise des sciences-serie des sciences biologiques, 20(1): 55-62.
- ZAVALETA-MEJIA, E.; A.E. CASTRO; V. ZAMUDIO. 1993. Effect of cropping and incorporation of crop residues of *Tagetes erecta* L. on the population development of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood on pepper (*Capsicum annuum* L.). Nematropica, 23(1): 49-56.
- ZUCKERMAN, B.M. 1971. Gnotobiology, In: B.M. ZUCKERMAN; W.F. MAI; R.A. ROHDE (ed.). Plant Parasitic Nematodes, Vol II, Academic Press, New York. p.159-184.

## 8. CAPITULO 6

### Produção 'in vivo' de *Pasteuria penetrans* em espécies de *Meloidogyne* com diferentes níveis do nematóide e de esterco de curral no substrato

FÁBIO RAMOS ALVES<sup>1,3</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>2</sup>, PAULO ROBERTO PALA MARTINELLI<sup>2</sup>; NAYLOR DANIEL DA COSTA AGUIAR<sup>2</sup>; RAQUEL FIALHO RUBIM<sup>2</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Parte da Dissertação de Doutorado em Fitopatologia do 1º autor desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa/UFV, <sup>2</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil, <sup>3</sup> e-mail: [fabioramosalves@yahoo.com.br](mailto:fabioramosalves@yahoo.com.br)

**Resumo** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; N.D. da C. Aguiar; R.F. Rubim & S. Ferraz. Produção 'in vivo' de *Pasteuria penetrans* em espécies de *Meloidogyne* com diferentes níveis do nematóide e de esterco de curral no substrato. **Nematologia Brasileira.**

Estudou-se o efeito de quatro diferentes proporções de solo, areia e esterco de curral, (1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (v:v:v), respectivamente), e três níveis de inóculo de espécies de *Meloidogyne* (3.000, 6.000 e 9.000 J2 por planta) na produção massal de *Pasteuria penetrans*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente ao acaso com oito repetições. O ensaio foi repetido uma vez e avaliado 50 dias após a inoculação das plantas. Plantas cultivadas no substrato 1:1:0 ou 2:2:1 apresentaram maior peso de matéria fresca e seca das raízes do que aquelas cultivadas no substrato 1:1:2. Maior número de galhas por planta ocorreu à medida que o nível de inóculo aumentou de 3.000 para 9.000 J2. Na primeira condução do experimento, plantas cultivadas no substrato 1:1:0 tiveram maior número de galhas em relação aos substratos 2:2:1 e 1:1:2, entretanto, na segunda condução experimento, plantas

cultivadas no substrato 2:2:1 apresentaram mais galhas quando comparadas àquelas dos demais substratos. O tamanho das fêmeas do nematóide foi maior quando as plantas foram inoculadas com 3.000 J2. Maior percentual de fêmeas infectadas por *P. penetrans* foi observado quando se utilizou o substrato 1:1:0 em relação aos substratos 1:1:1 e 1:1:2, e quando as plantas foram inoculadas com 3.000 J2. Na primeira condução do experimento, nas plantas cultivadas no substrato 1:1:0 ou inoculadas com 9.000 J2, obteve-se maior número de endósporos, entretanto, na segunda condução do experimento, as plantas inoculadas com 9.000 J2 e cultivadas no substrato 2:2:1 foram as que produziram mais endósporos. Maiores proporções de esterco de curral no substrato foram prejudiciais ao desenvolvimento do nematóide, e conseqüentemente à reprodução de *P. penetrans*.

**Palavras-chave:** *Pasteuria penetrans*, produção massal, níveis de inóculo, esterco.

**Summary** - Alves, F.R.; L.G. Freitas; P.R.P. Martinelli; N.D. da C. Aguiar; R.F. Rubim & S. Ferraz. 'In vivo' production of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne* species with different levels of nematode inoculum and cow manure in the substrate. **Nematologia Brasileira.**

The effect of four different proportions of clay soil, sand and cow manure (1:1:0; 2:2:1; 1:1:1 and 1:1:2 (V:V:V), respectively) and three inoculum levels of *Meloidogyne* species (3,000; 6,000 and 9,000 J2 per plant) on the reproduction of *Pasteuria penetrans* was evaluated. The experiment was carried out in greenhouse in a completely randomized design with eight replicates. The experiment was repeated once and plants were harvested and evaluated 50 days after inoculation. Plants cultivated in substrate 1:1:0 had higher dry root weight and fresh root weight when compared to the ones of the 1:1:2 substrate. Higher numbers of galls per plant were observed in the roots as the inoculum level increased from 3,000 to 9,000 J2. In the first experimental run, plants cultivated in the substrate 1:1:0 had more galls than in the substrates 2:2:1 and 1:1:2, however, in the second experimental run, plants cultivated in substrate 2:2:1 had

the highest number of galls. The females of the nematode were bigger in plants inoculated with 3,000 J2. Higher perceptual of females infected by *P. penetrans* was observed when the plants were cultivated in the substrate 1:1:0 than in the substrates 1:1:1 or 1:1:2, and when plants were inoculated with 3,000 J2. In the first experimental run, plants cultivated in the substrate 1:1:0 or inoculated with 9,000 J2 had higher endospore numbers. However, in the second run, plants inoculated with 9,000 J2 and cultivated in the substrate 2:2:1 yielded more endospores. Large proportions of cow manure in the substrate were prejudicial to nematode development and, consequently, to the reproduction of *P. penetrans*.

**Key-words:** *Pasteuria penetrans*, mass production, organic amendment, inoculum levels.

### **Introdução**

A bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr é um parasito obrigatório de grande potencial para o controle biológico de fitonematóides em condições de campo (Ciancio et al., 1992; Freitas et al., 2000) devido a várias características desejáveis que apresenta como agente de biocontrole (Dutky & Sayre, 1978; Dube & Smart Jr., 1987; Bird et al., 1990; Mousa, 1991; Tzortzakakis & Gowen, 1994). A produção de *P. penetrans* 'in vitro' é um desafio a ser superado pela pesquisa (Williams et al., 1989; Bishop & Ellar, 1991; Reise et al., 1991), pois a produção de grandes quantidades de endósporos dessa bactéria otimizará ainda mais seu uso como bionematicida (Campos et al., 1998). Na ausência de meios artificiais para a produção de *P. penetrans*, o método utilizado para sua multiplicação é o de Stirling & Wachtel (1980), no qual tomateiros são inoculados com 5.000 J2 de *Meloidogyne* sp. com endósporos aderidos em suas cutículas. Alguns trabalhos têm sido feitos objetivando a maximização da produção de endósporos de *P. penetrans* 'in vivo', como a utilização de nitrato de amônio adicionado ao substrato (Chen & Dickson, 1997), diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne* spp. e solo com diferentes texturas (Gomes, 2001; Sharma & Stirling, 1991) e diferentes espécies hospedeiras

(Cho et al., 1997; Rodrigues et al., 2003) e diferentes métodos de inoculação das plantas (Cho et al., 1997).

Uma outra alternativa visando a otimização da produção massal de *P. penetrans* 'in vivo' é a adição de materiais orgânicos ao substrato (Gomes, 2001), devido à grande influência que esses materiais exercem sobre a microbiota do solo e sobre as plantas (Alam et al., 1980; Riegel et al., 1996; Chavarria-Carvajal et al., 2001; Bulluck et al.; 2002; Kimpinski et al., 2003), porém, raros são os trabalhos sobre o efeito de resíduos orgânicos sobre a produção massal de *P. penetrans*.

Além do substrato, um outro fator de grande importância a ser considerado na produção massal de *P. penetrans* é a quantidade de nematóides a ser inoculada nas plantas (Stirling & Wachtel, 1980; Sharma & Stirling, 1991). Isso foi comprovado por Gomes (2001) ao inocular plantas com 1.000 ou 2.000 J2 e observar que o maior nível de inóculo do nematóide proporcionou maior número de endósporos por planta. Desta forma, objetivou-se neste trabalho estudar a interação entre níveis de inóculo de espécies de *Meloidogyne* e diferentes proporções de esterco de curral no substrato para a produção massal de *P. penetrans*.

### **Material e métodos**

Foram preparadas misturas de solo, areia e esterco de curral nas respectivas proporções 1:1:0; 2:2:1; 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V). O solo, areia e esterco foram homogeneizados manualmente e tratados com brometo de metila na dosagem  $200 \text{ cm}^3/\text{m}^3$  de substrato. Foram realizadas análises químicas do substrato no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (Tabela 1), sendo as adubações realizadas de acordo com as exigências da cultura do tomateiro.

Tabela 1. Resultado da análise química dos substratos compostos de solo, areia e esterco de curral nas seguintes proporções: 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V), respectivamente.

Substrato	pH	P	K	Na	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	MO
	H <sub>2</sub> O	mg/dm <sup>3</sup>			Cmol/dm <sup>3</sup>				dag/kg
1:1:0	4,75	3,6	22	-	0,61	0,21	0,5	5,8	2,36
2:2:1	5,57	21,0	91	-	1,10	0,92	0	2,6	2,76
1:1:1	5,78	52,5	163	-	1,43	1,25	0	4,5	3,10
1:1:2	6,02	146,6	115	-	1,62	1,80	0	0,0	3,43

Uma população mista de espécies de *Meloidogyne* com aproximadamente 60% de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) e 40% de *M. javanica* (Treub) Chitwood, foi obtida de plantas de tomate cv. Santa Clara cultivadas em casa de vegetação no campus da UFV e teve sua identificação e determinação da porcentagem de cada espécie na população determinadas por eletroforese de isoenzima. Ovos dos nematóides foram obtidos dos sistemas radiculares pela técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1981), colocados em câmaras de eclosão e mantidos a 26 °C para obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2). Os J2 eclodidos foram coletados diariamente em peneiras com abertura de malha de 25 µm (500 mesh), transferidos para um frasco tipo Erlenmeyer e mantidos em água com borbulhamento de ar até o momento de serem utilizados nos experimentos. A quantificação dos J2 foi feita em câmaras de Peters sob microscópio estereoscópio.

Para a obtenção de inóculo de *P. penetrans*, plantas de tomateiro cv. Santa Clara foram cultivadas em solo infestado com *P. penetrans* e J2 de *M. javanica* foram depositados ao redor das plantas de forma que pudessem entrar em contato com a bactéria no trajeto para a penetração das raízes, ocorrendo a adesão naturalmente. Após 70 dias da inoculação, as plantas foram removidas dos vasos e os sistemas radiculares separados da parte aérea. Fêmeas foram retiradas das raízes sob microscópio estereoscópio, transferidas para tubos tipo Eppendorf e

maceradas para a obtenção de uma suspensão de endósporos, cuja quantificação foi feita em câmara de Newbauer.

Após a obtenção do inóculo de espécies de *Meloidogyne* e de *P. penetrans*, 30 mL de suspensão aquosa contendo 10.000 J2 e  $1 \times 10^6$  endósporos da bactéria foi colocada em tubo plástico de 50 mL de capacidade e agitada em agitador orbital a 180 rpm por 30 minutos. A suspensão contendo os nematóides com cinco endósporos, em média, aderidos por J2 foi transferida para um Becker, que foi mantido a 8° C para interromper o processo de adesão, até o momento da instalação do experimento. Posteriormente, plantas de tomateiro cv. Santa clara com 20 dias de idade foram inoculadas com 3.000, 6.000 ou 9.000 de J2 com até 72 horas de idade.

Cinquenta dias após a inoculação, os sistemas radiculares foram separados das partes aéreas das plantas, lavados, pesados para a obtenção do peso da matéria fresca por planta (PMF) e avaliados quanto ao número de galhas por planta (NG). Posteriormente, retiraram-se 30 fêmeas por sistema radicular para medição das mesmas com auxílio de um tubo de imagem acoplado a um microscópio de luz. Cada fêmea foi desenhada, a imagem digitalizada e a área determinada com o uso do software Quant 1.0.1 (Vale et al., 2001). Determinou-se também a porcentagem de fêmeas infectadas por *P. penetrans* esmagando-se essas fêmeas individualmente entre lâmina e lamínula numa gota d'água e observando-a em microscópio de luz para a detecção de *P. penetrans*. Em seguida, foi determinado o número de endósporos por fêmea (NEF) avaliando-se dez fêmeas do nematóide, sabidamente infectadas por *P. penetrans*, de cada sistema radicular, sendo feitas as contagens em câmara de Newbauer, e o valor dividido por 10 para determinação do NEF. O passo seguinte foi a secagem das raízes em estufa de ventilação forçada (FABBE-Primar) a 70° C por 72 horas com posterior pesagem para determinação da matéria seca da raiz por planta (PMS), e moagem de cada sistema radicular individual em micro moinho (General Electric A-C mot), para obtenção de um pó fino de raiz (Stirling & Watchel, 1980). Finalmente, o número de endósporos por planta (NEP) foi determinado em câmara de Newbauer.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4 (três níveis de inóculo de espécies de *Meloidogyne* e quatro substratos), com 8 repetições. O período experimental foi de fevereiro a abril de 2003, sendo a segunda condução do experimento montada 14 dias após a primeira.

Para a primeira condução do experimento, os dados das variáveis PMF, PMS, NG e endósporos foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ . Essa mesma transformação de dados foi utilizada para PMF e PMS da segunda condução do experimento. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias dos dados qualitativos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade através do programa SAS<sup>®</sup> versão 6.12..

## **Resultados e discussão**

Maiores pesos de matéria fresca (PMF) e seca (PMS) de raiz por planta ( $P \leq 0,05$ ) foram observados quando se utilizou substrato que não recebeu matéria orgânica (1:1:0) ou no substrato 2:2:1, ao contrário, os menores PMF e PMS foram observados no substrato 1:1:2 em ambas as conduções do experimento (Figura 1). O PMF e PMS estão diretamente relacionados ao número de galhas, como pode ser observado ao se comparar as Figuras 1 e 3. As galhas são tumores resultantes do aumento do número de células nas raízes e, conseqüentemente, sua massa. À medida que o nível de inóculo subiu de 3.000 para 9.000 J2, observou-se aumento do número de galhas por planta (NG) em ambas as conduções do experimento (Figura 2). Na primeira condução do experimento, o número de galhas foi maior ( $P \leq 0,05$ ) em plantas cultivadas em substrato sem matéria orgânica, comparado com os substratos 2:2:1 e 1:1:2 (Figura 3). Já na segunda condução do experimento, o maior número de galhas ( $P \leq 0,05$ ) foi observado em plantas cultivadas no substrato 2:2:1 em relação aos demais (Figura 3). Observando as Figuras 1 e 3, verifica-se que o PMF, PMS e NG são consideravelmente maiores

na segunda condução do experimento. Gomes (2001) ressaltou que a matéria orgânica utilizada em seu estudo permitiu o desenvolvimento de raízes mais vigorosas e abundantes implicando em maior PMF e PMS, o que está em concordância com os resultados obtidos na segunda condução do experimento, porém em discordância com os dados da primeira condução (Figura 1). É conveniente lembrar que a segunda condução do experimento foi instalada duas semanas após a primeira, com isso, o material orgânico adicionado ao substrato, no momento da instalação da segunda condução, provavelmente estava em estágio mais avançado de decomposição, liberando mais nutrientes no substrato, o que levou as plantas a se desenvolverem mais e apresentarem sistemas radiculares mais abundantes, o que implicou em mais formação de sítios de penetração para os nematóides e, conseqüentemente, maior número de galhas. Entretanto, quando níveis mais altos de esterco foram utilizados (1:1:1 e 1:1:2) menos galhas foram formadas, o que pode ser conseqüência da atuação de compostos tóxicos aos nematóides, produzidos pela matéria orgânica. Essas observações estão em concordância com aquelas feitas por Riegel et al., (1996); Viaene & Abawi, (1998); Lazarovits et al., (2001) e Nico et al., (2004).

Quando as plantas foram inoculadas com 9.000 J2, houve maior formação de galhas no sistema radicular em relação aos dois menores níveis de inóculo (Figura 2). À medida que o nível de inóculo de nematóide aumenta, mais galhas radiculares são formadas (Gomes, 2001; Gonçalves, 1998). O tamanho das fêmeas e o percentual de fêmeas infectadas por *P. penetrans* foram maiores quando se utilizou o menor nível de inóculo do nematóide, ou seja, 3.000 J2 (Figura 4 e 5), possivelmente, por haver menor competição por sítios de alimentação e, desta forma, os nematóides, por terem mais alimento disponível, crescem mais, permitindo que a *P. penetrans* tenha maior possibilidade de se desenvolver e completar seu ciclo. Essas afirmações corroboram com aquelas feitas por Cho et al. (1997). Maior percentual de fêmeas infectadas por *P. penetrans* ( $P \leq 0,05$ ) foi observado quando se utilizou substrato sem matéria orgânica do que nos substratos 1:1:1 e 1:1:2 na primeira condução do experimento (Figura 6). As raízes das plantas cultivadas em substrato com maiores proporções de matéria orgânica

apresentaram maior teor de fenóis ( $P \leq 0,05$ ) como se pode observar na Figura 1 do capítulo 5, o que possivelmente dificultou a penetração e estabelecimento dos J2 com *P. penetrans* nas raízes. Alam et al., (1980) observaram aumento nos níveis de fenóis em raízes de tomateiro de 12,9 a 151,8% quando essas plantas passaram a ser cultivadas em substratos que receberam resíduos orgânicos, e essas maiores concentrações de fenóis estavam relacionadas com menor penetração do sistema radicular pelos nematóides. Segundo Giebel (1974), entre as substâncias produzidas pelas plantas que estão envolvidas na resistência a fitopatógenos, os compostos fenólicos são os que merecem maior destaque. Alguns autores afirmam que há uma correlação positiva entre resistência de plantas a fitopatógenos e conteúdo de fenóis nos tecidos radiculares (Pitcher et al., 1960; Giebel, 1970; Zuckerman, 1971; Singh et al., 1983; Valette et al., 1998). De fato, compostos fenólicos estimulam a síntese do AIA-oxidase, o que favorece a degradação da auxina, comprometendo a formação das células gigantes (Giebel, 1974). Os relatos desse autor são confirmados nesse estudo pelas observações feitas nas células gigantes das plantas cultivadas em substratos que receberam as maiores quantidades de matéria orgânica, ou seja, 1:1:1 ou 1:1:2. Esses sítios de alimentação, conforme ilustrado nas Figuras 3, 4 e 5 do capítulo 5, apresentaram-se menores, menos numerosos, com deformações, com paredes mais espessas e com menor número de núcleos se comparados com aqueles de plantas crescidas nos substratos 1:1:0 e 2:2:1. Alguns autores também relataram que houve má formação de células gigantes em plantas resistentes ou más hospedeiras de *Meloidogyne* spp. (Bleve-Zacheo et al., 1982; Pedrosa et al., 1996; Rodrigues et al., 2003).

Na primeira condução do experimento, maior número de endósporos ( $P \leq 0,05$ ) foi observado nas plantas cultivadas sem adição de esterco (1:1:0) (Figura 7), e o número de endósporos foi maior quando plantas foram inoculadas com 9.000 J2 (Figura 8). Na segunda condução do experimento, as plantas inoculadas com 9.000 J2 e cultivadas no substrato com pouco esterco (2:2:1) foram as que apresentaram maior número de endósporos (Figuras 9). A maior produção de endósporos quando se utilizou maior nível de inóculo de espécies de

*Meloidogyne* está de acordo com os dados encontrados por Gomes (2001) que observou que plantas inoculadas com 2.000 J2 permitiram multiplicação de *P. penetrans* de até 2,5 vezes superior àquelas que receberam 1.000 J2. Na primeira condução do experimento, o substrato composto apenas por solo e areia resultou em mais galhas, maior PMF, PMS e percentual de fêmeas infectadas por *P. penetrans* (Figura 6) do que nos substratos 1:1:1 e 1:1:2, portanto, é de se esperar que nesse substrato obtenha-se maior número total de endósporos por planta, como de fato ocorreu.

Não houve efeito significativo do material orgânico sobre o tamanho das fêmeas do nematóide. O número máximo de endósporos produzido por planta na segunda condução do experimento foi mais de três vezes superior àquele obtido nas plantas da primeira condução (Figuras 7 e 9). Essa diferença pode ser explicada pela diferença de temperatura entre os dois períodos experimentais (23,5 e 22,5° C na primeira e segunda condução do experimento, respectivamente). Assim, apesar de a matéria orgânica ter proporcionado maior PMF, PMS e NG na segunda condução do experimento, a temperatura foi mais importante para a produção total de endósporos na primeira condução do experimento. Segundo Hatz & Dickson (1992), um dos fatores que mais afeta o desenvolvimento da *P. penetrans* é a temperatura. Os autores observaram que à medida que a temperatura aumentou de 20 para 30 °C, o número de endósporos produzidos por sistema radicular aumentou de 12,5 milhões para 115 milhões.

Conclui-se com este trabalho que tanto o substrato sem incorporação de esterco de curral ou com acréscimo de pequenas quantidades desse resíduo orgânico permitiram maior reprodução da *P. penetrans*, por outro lado, a utilização das duas maiores proporções de esterco no substrato foi prejudicial ao desenvolvimento dos nematóides e, conseqüentemente, da *P. penetrans*, não sendo, portanto, recomendado o acréscimo dessas maiores quantidades de esterco de curral ao substrato para a multiplicação da *P. penetrans*.

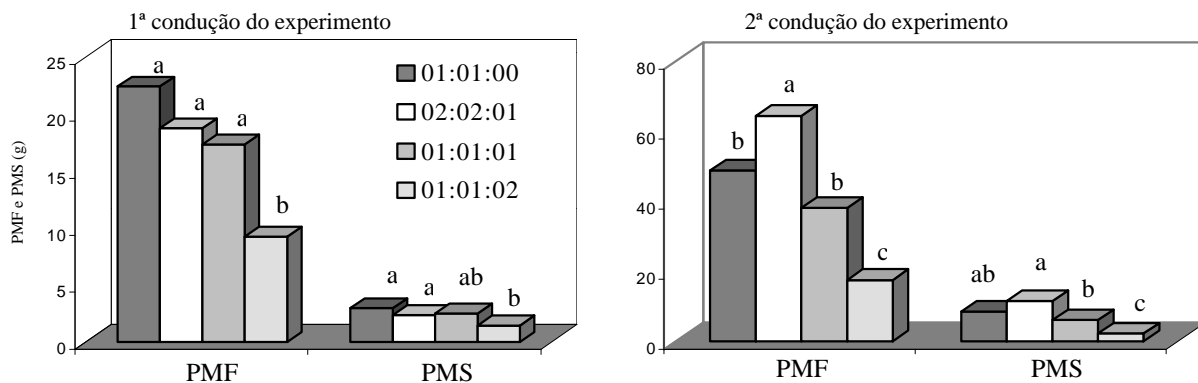


Figura 1. Peso da matéria fresca (PMF) e seca (PMS) de raízes de tomateiro cv. Santa Clara cultivado em solo, areia e esterco de gado nas respectivas proporções, 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

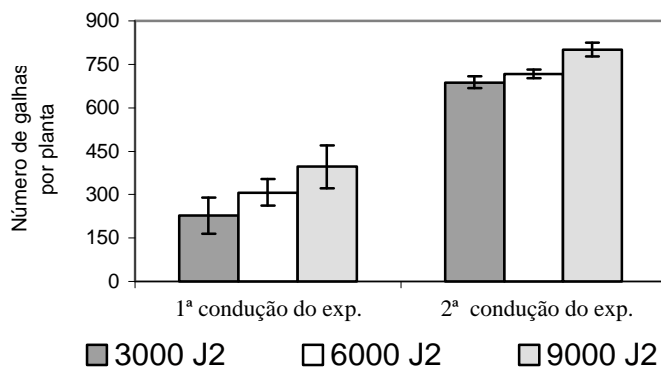


Figura 2. Número de galhas por sistema radicular de tomateiro cv. Santa Clara inoculado com 3.000, 6.000 ou 9.000 juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de *Meloidogyne* nas duas conduções do experimento. As barras nas colunas representam o intervalo de confiança ao nível de 5% de probabilidade.

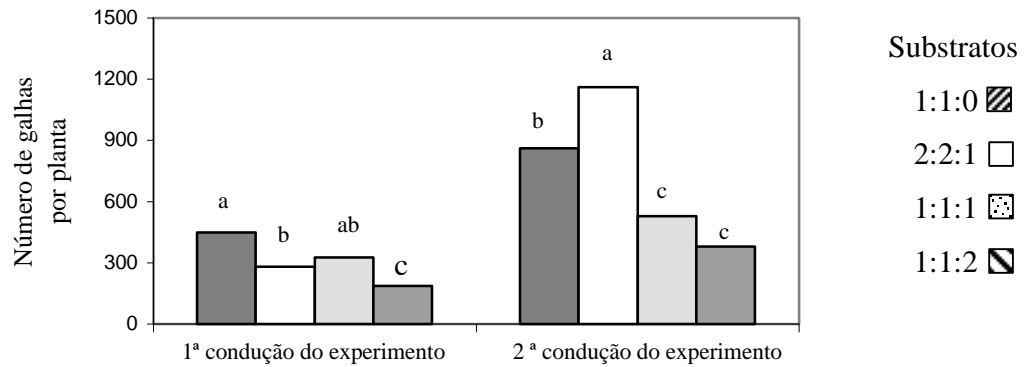


Figura 3. Número de galhas por sistema radicular de tomateiro inoculado com espécies de *Meloidogyne* e cultivado em solo, areia e esterco de gado nas respectivas proporções, 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V) nas duas conduções do experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

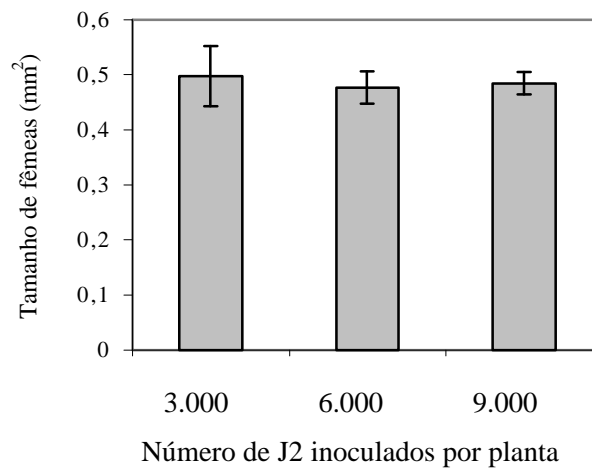


Figura 4. Tamanho de fêmeas de espécies de *Meloidogyne* parasitando tomateiros cv. Santa Clara inoculados com 3.000, 6.000 ou 9.000 juvenis de segundo estágio (J2) do nematóide. As barras nas colunas representam o intervalo de confiança ao nível de 5% de probabilidade.

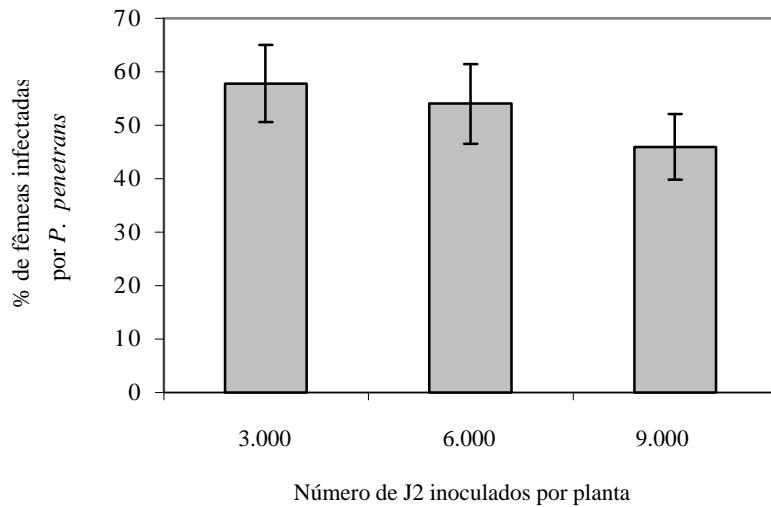


Figura 5. Percentual de fêmeas de espécies de *Meloidogyne* infectadas por *P. penetrans* quando plantas de tomateiros cv. Santa Clara foram inoculados com 3.000, 6.000 ou 9.000 juvenis de segundo estágio (J2) do nematóide. As barras nas colunas representam o intervalo de confiança ao nível de 5% de probabilidade.

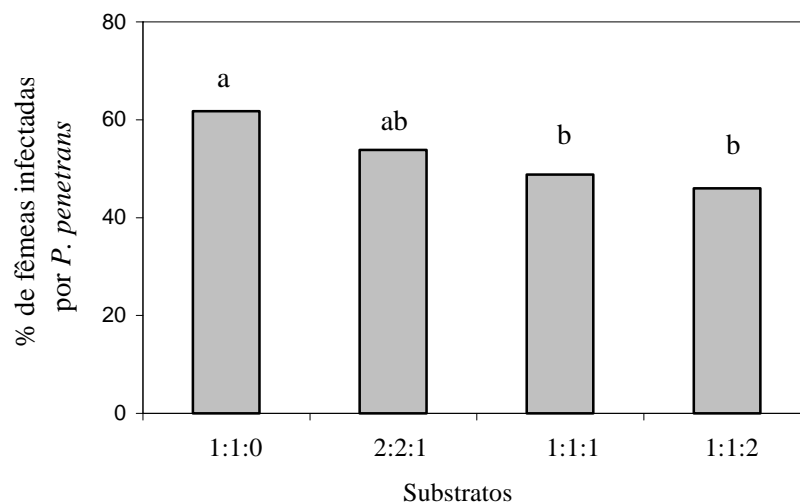


Figura 6. Percentual de fêmeas de espécies de *Meloidogyne* infectadas por *P. penetrans* e parasitando plantas de tomateiro cv. Santa Clara cultivado em solo, areia e esterco de gado nas respectivas proporções, 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V).

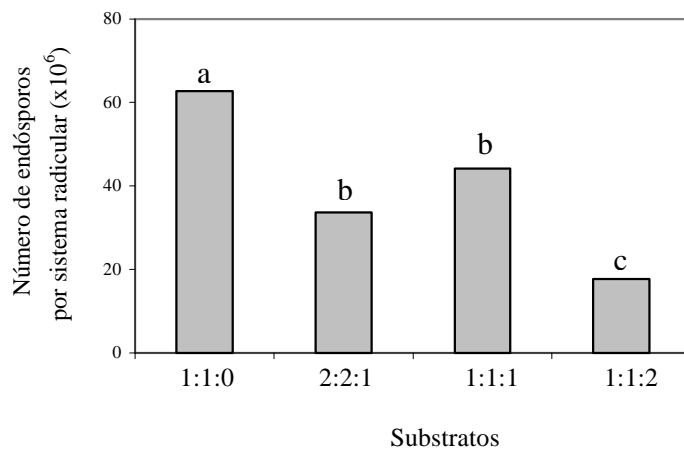


Figura 7. Número de endósporos de *P. penetrans* por sistema radicular de tomateiro cv. Santa Clara cultivado em solo, areia e esterco de gado nas respectivas proporções, 1:1:0, 2:2:1, 1:1:1 e 1:1:2 (V:V:V) na primeira condução do experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

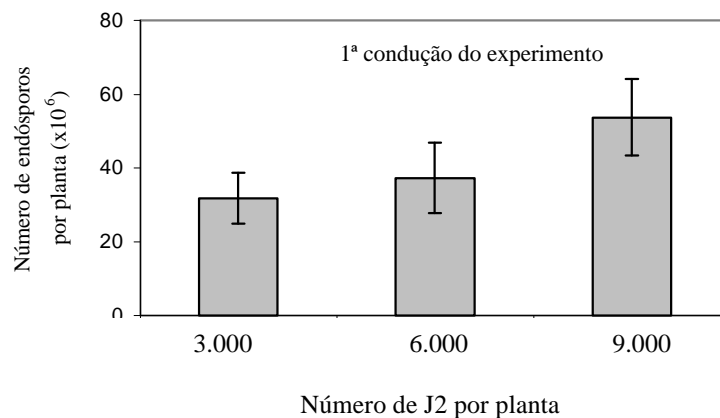


Figura 8. Número de endósporos de *P. penetrans* por sistema radicular de tomateiro cv. Santa Clara inoculado com 3.000, 6.000 ou 9.000 juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de *Meloidogyne*. As barras nas colunas representam o intervalo de confiança ao nível de 5% de probabilidade.

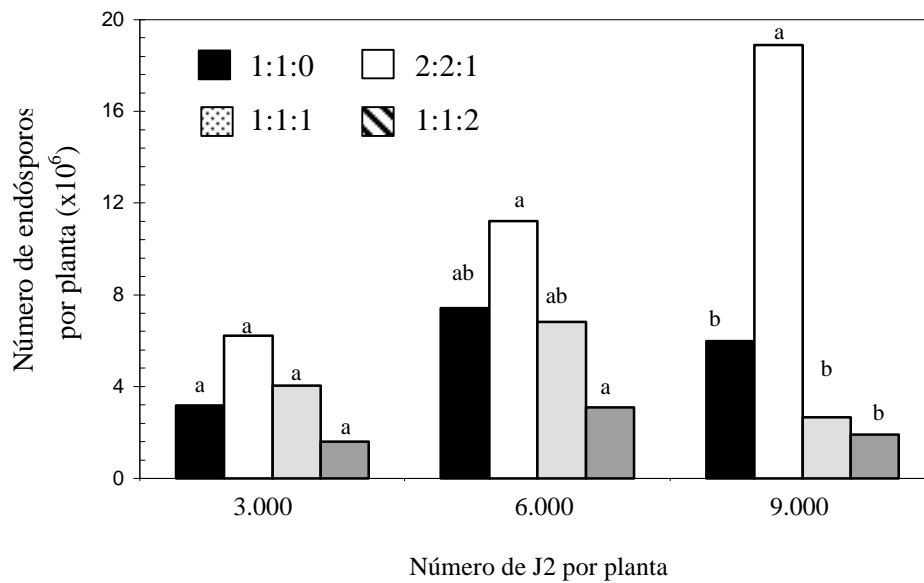


Figura 9. Número de endósporos de *P. penetrans* por sistema radicular de tomateiro cv. Santa Clara inoculado com 3.000, 6.000 ou 9.000 juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de *Meloidogyne* na segunda condução do experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

## Referências bibliográficas

- ALAM, M.M.; M. AHMAD; A.M. KHAN. 1980. Effect of organic amendments on the growth and chemical composition of tomato, eggplant and chilli and their susceptibility to attack by *Meloidogyne incognita*. Plant and Soil, 57: 231-236.
- BIRD, A.F.; P.G. BRISBANE; S.G. McCLURE; R.W.L. DIMBER. 1990. Studies on the properties of the spores of some populations of *Pasteuria penetrans*. Journal of invertebrate pathology, 55(2): 169-178.
- BISHOP, A.H.; D.J. ELLAR. 1991. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* 'in vitro'. Biocontrol Science and Technology, 1: 101-114.
- BLEVE-ZACHEO, T.; G. ZACHEO; M.T. MELILLO; F. LAMBERTI. 1982. Ultrastructural aspects of the hypersensitive reaction tomato root cells resistant to *Meloidogyne incognita*. Nematologia Mediterrânea, 10: 81-90.
- BONETI, J.I.; S. FERRAZ. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Porto Alegre, RS. Fitopatologia Brasileira. Porto Alegre, 6:553.
- BULLUCK, L.R.; K.R. BARKER; J.B. RISTAINO. 2002. Influences of organic and synthetic soil fertility amendments on nematode trophic groups and community dynamics under tomatoes. Applied Soil Ecology, 21(3): 233-250.
- CAMPOS, V.P.; J. T. de SOUZA; R.M. SOUZA. 1998. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 6: 285-327.
- CHAVARRIA-CARVAJAL, J.A.; R. RODRIGUEZ-KABANA; J.W. KLOEPPER; G. MORGAN-JONES. 2001. Changes in populations of microorganisms associated with organic amendments and benzaldehyde to control plant-parasitic nematodes. Nematropica, 31(2): 165-180.

- 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 inoculation method, *Meloidogyne* spp., and different host plant for production of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 29(4): 573-574.
- CIANCIO, A.; R. MANKAU; M. OCAMPO. 1992. Parasitism of *Helicotylenchus lobus* by *Pasteuria penetrans* in naturally infested soil. *Journal of Nematology*, 24(1): 29-35.
- DUBE, B.; C.G. SMART, Jr. 1987. Biological control of *Meloidogyne incognita* with *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 19: 222-227.
- DUTKY, E.M.; R.M. SAYRE. 1978. Some factors affecting infection of nematodes by the bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology*, 10: 285 (abstr.).
- FREITAS, L.G.; W.S. NEVES; D.N. CARMO; G.S. SILVA. 2000. First case of induction of soil suppressiveness to root-knot nematode by *Pasteuria penetrans* in large areas in the field in Brazil. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Nematologia*, Uberlândia, MG, 129.
- GIEBEL, J. 1974. Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes: A review. *Journal of Nematology*, 6(4): 175-184.
- GIEBEL, J. 1970. Phenolic content in roots of some solanaceae and its influence on IAA-oxidase activity as an indicator of resistance to *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 16: 22-32.
- GOMES, C.B. 2001. Métodos para o aprimoramento da multiplicação de *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr "in vivo". Tese de doutorado, Viçosa, MG, UFV, 60p.
- GONÇALVES, W. 1998. Efeitos de diferentes níveis de inóculo na avaliação precoce da reação do cafeeiro a *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, 22(1): 75-81

- HATZ, B.; D.W. DICKSON. 1992. Effect of of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 24(4): 512-521.
- KIMPINSKI, J.; C.E. GALLANT; R. HENRY; J.A. MACLEOD; J.B. SANDERSON; A.V. STURZ. 2003. Effect of compost and manure soil amendments on nematodes and on yields of potato and barley: A 7-year study. *Journal of Nematology*, 35(3): 289-293.
- LAZAROVITS, G.; M. TENUTA; K.L. CONN. 2001. Organic amendments as a disease control strategy for soil borne diseases of high-value agricultural crops. *Australasian Plant Pathology*, 30(2): 111-117.
- MOUSA, E.M. 1991. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. *Journal of Nematology*, 23(4): 542 (abstr.).
- NICO, A.I.; R.M. JIMENEZ-DIAZ; P. CASTILLO. 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Protection*, 23(7): 581-587.
- PEDROSA, E.M.R.; R.S. HUSSEY; H.R. BOERMA. 1996. Cellular responses of resistant and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. *Journal of Nematology*, 28(2): 225-232.
- PITCHER, R.S.; Z.A. PATRICK; W.B. MOUNTAIN. 1960. Studies on the host-parasite relations of *Pratylenchus penetrans* (Cobb) to apple seedlings. *Nematologica*, 5: 309-314.
- REISE, R.W.; K.T. HACKETT; R.N. HUETELL, 1991. Limited cultivation of *Pasteuria nishizawae*. *Journal of Nematology*, 23(4): 547-548 (abstr.).
- RIBEIRO, R.C.F.; E.H. MIZOBUTSI, D.G. SILVA; J.C.R. PEREIRA; L. ZAMBOLIM. 1998. Controle de *Meloidogyne javanica* em alface por meio de compostos orgânicos. *Fitopatologia Brasileira*, 23(1): 42-44.
- RIEGEL, C.; F.A. FERNANDEZ; J.P. NOE. 1996. *Meloidogyne incognita* infested soil amended with chicken litter. *Journal of Nematology*, 28(3): 369-378.

- RODRIGUES, A.K.; L.G. FREITAS; A.A. AZEVEDO; S. FERRAZ. 2003. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. parasitando diferentes espécies vegetais. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3): 267-272.
- SHARMA, R.D.; G.R. STIRLING. 1991. *In vivo* mass production systems for *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 37: 483-484.
- SINGH, S.P.; V. PANT; A.M. KHAN; S.K. SAXENA. 1983. Attractiveness of *Meloidogyne incognita* larvae to roots of tomato and changes in biochemical content of plants as affected by oilcakes and nematicides. *Nematologia Mediterrânea*, 11: 119-123.
- STIRLING, G.R.; M.F. WACHTEL. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, 26: 308-312.
- TZORTZAKAKIS, E.A.; S.R. GOWEN. 1994. Evaluation of *Pasteuria penetrans* alone and in combination with oxamyl, plant resistance and solarization for control of *Meloidogyne* spp. in vegetables grown in greenhouses in Crete. *Crop Protection*, 13(6): 455-462.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R.; ZAMBOLIM, L. 2001. Quant – a software to quantify plant disease severity In: VIII International workshop on plant disease epidemiology, Ouro Preto – MG. International workshop on plant disease epidemiology, 8., Ouro Preto: International Society of Plant Pathology, 2001. 160p.
- VALETTE, C.; C. ANDARY; J.P. GEIGER; J.L. SARAH; M. NICOLE. 1998. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Phytopathology*, 88(11): 1141-1148.
- VIAENE, N.M.; G.S. ABAWI. 1998. Management of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as a cover crop. *Plant Disease*, 82(8): 945-952.
- WILLIAMS, A.B.; G.R. STIRLING; A.C. HAYWARD; J. PERRY. 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Applied Bacteriology*, 67: 145-156.

ZUCKERMAN, B.M. 1971. Gnotobiology, In: ZUCKERMAN, B.M.; W.F. MAI; R.A. ROHDE  
(ed.). Plant Parasitic Nematodes, Vol II, Academic Press, New York. p.159-184.

## CONCLUSÕES GERAIS

Em tomateiros cv. Santa Clara houve produção de três vezes mais endósporos que em cv. TRural I, que tem porte reduzido, maior resistência às pragas e doenças da parte aérea e ocupam menos espaço, portanto pode ser opção viável para a multiplicação de *P. penetrans*.

Para que se obtenham de 6 a 10 endósporos aderidos por J2, que é a quantidade ideal de endósporos para multiplicação 'in vivo' de *P. penetrans*, é necessária concentração de  $3,3 \times 10^4$  endósporos/mL e 50 minutos de agitação, ou  $3,3 \times 10^5$  endósporos/mL e 10 a 15 minutos de agitação.

A produção de *P. penetrans* foi maior na população de *Meloidogyne incognita*, mantida em casa de vegetação do que na população mista de *M. incognita* e *M. javanica* oriunda do campo, pois, os endósporos aderiram-se melhor em J2 da população pura de *M. incognita*.

A inoculação de plantas com 30 a 45 dias de idade com 25.000 J2 de espécies de *Meloidogyne* permitiu uma produção de endósporos de até dezenove vezes superior àquela obtida no método clássico proposto por Stirling & Wachtel (1980), inoculando-se plantas com 5.000 J2.

Não se detectou efeito do nível de esterco de curral sobre lipídios de espécies de *Meloidogyne*.

À medida que a proporção de matéria orgânica no substrato foi aumentada ou quando as plantas foram inoculadas com maior quantidade de J2 (9.000 J2), observou-se aumento nas concentrações de fenóis nas raízes.

As células gigantes de plantas cultivadas no substrato 1:1:0 e 2:2:1 (solo:areia:esterco, V:V:V) foram mais abundantes, maiores e com maior número de núcleos do que as observadas em plantas conduzidas em substrato com mais esterco (1:1:1 e 1:1:2).

A utilização de substrato sem esterco de curral ou com poucas quantidades desses resíduos é benéfica para o incremento da produção massal de *P. penetrans*. Entretanto, a adição das duas

maiores proporções de esterco ao substrato prejudicou o desenvolvimento dos nematóides e, conseqüentemente, de *P. penetrans*.