

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 116

**Utilização *Pasteuria penetrans*
em controle biológico de
Meloidogyne javanica em Duas
Culturas Sucessivas de Alface e
Tomate.**

Cleide Alves Moraes Pimenta
Regina M. D. Gomes Carneiro

Brasília, DF
2005

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto

Presidente

Silvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Helio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana

Diretores Executivos

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Maria Isabel de Oliveira Penteado

Secretária-Executiva: Maria da Graça Simões Pires Negrão

Membros: Arthur da Silva Mariante

Maria Alice Bianchi

Maria da Graça S. P. Negrão

Maria de Fátima Batista

Maria Isabel de O. Penteado

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor Editorial: Maria da Graça Simões Pires Negrão

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de Ilustrações: Altevir de Carvalho Freitas

Editoração Eletrônica: Altevir de Carvalho Freitas

2ª edição

1ª impressão (2004): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

P 644 Pimenta, Cleide Alves Moraes.

Utilização Pasteuria penetrans em controle biológico de Meloidogyne javanica em duas culturas sucessivas de alface e tomate / Cleide Alves Moraes Pimenta, Regina M. D. Gomes Carneiro. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

36 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 116)

1. Meloidogyne javanica – controle biológico. 2. Alface – cultura.
3. Tomate – cultura. I. Carneiro, Regina M. D. Gomes. II. Título. III. Série.

Utilização *Pasteuria penetrans* em controle biológico de *Meloidogyne javanica* em Duas Culturas Sucessivas de Alface e Tomate.

Cleide Alves Moraes Pimenta²

Regina M. D. Gomes Carneiro³

Resumo

Foi testada a eficiência de *Pasteuria penetrans* no controle de *Meloidogyne javanica*, quando veiculada em substrato de mudas de alface, em duas concentrações 10^5 e 10^6 endósporos/grama de substrato, após dois cultivos consecutivos de alface (primeiro ensaio) e tomate (segundo ensaio), em tratamentos com incorporação ou não dos sistemas radiculares da alface. Avaliou-se também, a influência do pousio no controle induzido pela bactéria. O experimento foi conduzido em casa de vegetação. O delineamento foi em blocos ao acaso com 16 tratamentos e 10 repetições. No primeiro e segundo ensaios, foi observada a presença de endósporos de *P. penetrans* em todos os tratamentos cujo substrato foi tratado, o que mostrou ser possível introduzir a bactéria através de mudas, mesmo com uma perda inicial significativa, da ordem de 10^3 endósporos/muda, por lixiviação na água de irrigação da sementeiras. No primeiro ensaio *Pasteuria penetrans* não exerceu nenhuma redução na densidade populacional de *M. javanica* em alface, o que demonstrou que o controle exercido por *P. penetrans* não foi eficiente, possivelmente devido ao pequeno número de endósporos presentes no solo, medido pela percentagem de juvenis de segundo estádio (J2) infectados e número médio de endósporos/J2. No segundo ensaio, *P. penetrans* exerceu redução significati-

¹ Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora defendida junto ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília

² Engenheira Agrônoma, Mestranda UnB, Estagiária , Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília (DF)

³ Engenheira Agrônoma, PhD, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia C.P.02372, 70849-970, Brasília (DF). recar@cenargen.embrapa.br

va, da ordem de 10 vezes, nas populações de *M. javanica*, nas duas concentrações da bactéria, em tomateiros da cultivar Santa Cruz. Embora não tenha ocorrido um controle efetivo do nematóide, a maior concentração de *P. penetrans* (10^6) acarretou maior redução dos níveis populacionais do nematóide, sobretudo nos tratamentos com a incorporação do sistema radicular da alface. A percentagem de J2 infectados com a bactéria e o número de endósporos aderidos/J2 aumentaram significativamente, com a incorporação do sistema radicular, o que mostrou que o inóculo residual da bactéria trazido pelas raízes foi significativo no aumento da supressividade. O elevado número de fêmeas parasitadas por *P. penetrans*, no segundo ensaio, com plantas de tomate, mostrou a tendência a um aumento na concentração de inóculo da bactéria para a próxima geração de *M. javanica*. Os resultados tratamentos com pousio não foram satisfatórios quanto à redução dos níveis populacionais do nematóide e quanto aos níveis de supressividade induzidos pela bactéria.

Palavras-chave: *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne javanica*, alface, tomate, mudas, pousio, controle.

Utilização *Pasteuria penetrans* em controle biológico de *Meloidogyne javanica* em Duas Culturas Sucessivas de Alface e Tomate.

Abstract

The efficiency of *Pasteuria penetrans* was tested on the control of *Meloidogyne javanica*, after two consecutive cultivation of lettuce (first assay) and tomato (second assay) in pots under glasshouse conditions. The bacteria was applied in the substrate of lettuce seedlings, in two concentrations, 10^5 and 10^6 endospores/g of substrate, in treatments with incorporation or not of lettuce root system. The influence of fallow was also evaluated on the control caused by the bacterium. In both the assays, *P. penetrans* was present in treatments where the substrate were treated previously with the bacterium. These results demonstrated the efficacy of *P. penetrans* inoculation through seedlings even considering the significant loss of endospores (10^3 /seedlings) through leakage irrigation water. The bacterium did not cause any significant decrease in the nematode population densities, in the first assay, showing that the control by *P. penetrans* was not efficient due to the reduced numbers of endospores present in soil. In the second assay, both concentration of the bacterium resulted in a significant reduction of 10 times in the *M. javanica* population, in tomato cv. Santa Cruz compared to the control plots, nevertheless, an effective control did not occur as demonstrated by the index of galls and egg masses. The higher concentration (10^6 endospors/g of substrate) of the bacterium resulted in decrease of the nematode population level, mainly in the treatment where lettuce root system was incorporated. The percentage of infected second-stage juveniles (J2) and the numbers of attached endospores/J2 increased significantly with the incorporation of the lettuce roots, showing that the residual bacterium inoculum brought to the roots was sufficient to promote the

supression. The significant number of bacterium-infected females, in the second experiment with tomato plants, possibly will increase the concentration of the bacterium inoculum to the next generation of *M. javanica*. The fallow treatments did not allow satisfactory results in reduction of nematode population levels. Also, the nematode suppression caused by the bacterium was lower under fallow treatments.

Key-words: *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne javanica*, lettuce, tomato, seedlings, fallow, control.

Introdução

Dentre os nematóides fitoparasitas, os formadores de galhas, *Meloidogyne* spp., constituem o grupo mais importante para as hortaliças devido a sua ampla distribuição em todo país, polifagia, diferença biológica ligada ao parasitismo entre populações da mesma espécie, o que dificulta a implementação de programas de resistência varietal e rotação de culturas, que são as medidas de controle mais eficientes e viáveis em nossas condições. Sabe-se, que é praticamente impossível eliminar os nematóides das galhas de uma área infestada. A utilização de técnicas de manejo é a única forma viável de reduzir as populações do parasita a níveis inferiores àqueles capazes de causar prejuízos, sem riscos de contaminação do meio ambiente. Nos últimos anos a preocupação em substituir os agrotóxicos por agentes de controle biológico tem sido um dos objetivos das pesquisas em nematologia (Carneiro, 1992). Mais de 200 diferentes organismos são considerados inimigos naturais dos fitonematóides como fungos, bactérias, nematóides predadores, tardígrados, colembolas e ácaros (Poinar & Jansson, 1988a, 1988b; Kerry, 1990). Entretanto, dentre esses inimigos naturais, apenas algumas espécies de fungos e de bactérias apresentam potencial para serem usados racionalmente como agentes de controle biológico (Souza, 1997). Dentre esses, as bactérias gram positivas e formadoras de micélio e endósporos do gênero *Pasteuria* Metchnikoff, 1888 (Starr & Sayre, 1988), são consideradas por muitos pesquisadores como um dos mais promissores agentes de controle biológico de nematóides, não só pela agressividade, mas também pela rusticidade (Stirling, 1984; Brown *et al.*, 1985; Stirling, 1985; Sayre, 1986; Bird & Brisbane, 1988). Esse potencial é atribuído a sua habilidade em controlar fitonematóides em diversas culturas (Jatala, 1986), resistência dos endósporos à dessecação e temperaturas extremas (Dutky & Sayre, 1978; Oostendorp *et al.*, 1990), compatibilidade com vários pesticidas (Dube & Smart Jr., 1987; Daudi & Gowen, 1992; Tzortzakakis & Gowen, 1994) e com outros microorganismos, como os fungos nematófagos (Mousa, 1991; Dube, 1987). Esta bactéria, *Pasteuria penetrans* (Thorne, 1940) Sayre & Starr (1985), pode atuar sobre a fêmea do nematóide das galhas inibindo a produção de ovos ou mesmo impedindo o juvenil de segundo estágio (J2) de penetrar nas raízes, atuando assim como um nematicida biológico. Este organismo é muito resistente a intempéries climáticas, podendo persistir por anos no solo (Campos, 1992). Além disso, vários campos onde os nematóides das galhas limitavam a produção agrícola, agora se encontram supressivos aos nematóides devido a presença da bactéria (Mankau, 1980; Stirling, 1981; Ciancio *et al.*, 1992).

Embora, o seu uso como nematicida biológico seja limitado, devido à falta de um

meio de cultura artificial, em que a bactéria possa ser produzida em larga escala, o uso deste microorganismo em um sistema de manejo integrado de nematóides faz com que a sua ação se potencialize com o tempo, até que o solo se torne supressivo ao nematóide. A sua produção, nesse caso, pode ser feita em casa de vegetação, em quantidades suficientes para a sua introdução em pequenas áreas ou em mudas (Freitas & Carneiro, 2000). Não existem praticamente informações quanto a utilização e eficiência de *P. penetrans* quando introduzida em mudas de hortaliças. Desse modo, foram objetivos deste trabalho: 1) Testar a eficiência de *P. penetrans* no controle de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, quando veiculada em substrato de mudas de alface, em duas concentrações da bactéria, após os cultivos consecutivos, de alface e de tomate; 2) Avaliar a influência de duas cultivares de alface, com diferentes suscetibilidades a *M. javanica*, quanto ao índice de reprodução do nematóide e o grau de supressividade induzido pela bactéria; 3) Avaliar o nível de supressividade a *M. javanica* induzido por duas doses de *P. penetrans* quando os sistemas radiculares da alface forem retirados ou incorporados ao solo e 4) Avaliar o efeito do pousio no controle de *M. javanica* e no grau de supressividade induzido pela bactéria.

Material e Métodos

Foram realizados dois ensaios consecutivos, sendo o primeiro com duas cultivares de alface lisa cv. Karla, altamente suscetível a *M. javanica*, e crespa cv. Hortencia, moderadamente resistente ao nematóide (Carneiro *et al.*, 2000), no período de agosto a outubro de 2000. O segundo, com tomateiro c.v. Santa Cruz, no período de novembro de 2000 a fevereiro de 2001. Os dois ensaios foram realizados em casa de vegetação nas dependências da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Núcleo Temático de Controle Biológico, Brasília – DF.

1) Produção do formulado de *Pasteuria penetrans*

Foi utilizado o isolado B4 de *P. penetrans* proveniente da coleção da Universidade da Flórida em 1998. Este isolado apresentou alto índice de adesão a *M. javanica*, segundo Carneiro *et al.* (1999).

O isolado B4 foi multiplicado em casa de vegetação, utilizando-se a metodologia descrita por Stirling & Wachtel (1980), sendo a bactéria *P. penetrans* cultivada em *M. javanica*, parasitando tomateiros, cultivar Santa Cruz. Após duas gerações do nematóide na planta hospedeira, os sistemas radiculares foram separados das partes aéreas, lavados, secos ao ar, moídos em um micro moinho (Marconi MA

048), até que todo o material passasse por uma peneira de 10 mesh para produção do pó de raiz.

2) Quantificação de endósporos de *Pasteuria penetrans*

Uma amostra de 0,5 g de pó de raiz foi colocada em 1,0 ml de solução a 50 % de pectinase (Rapidase-Polimaq, 2F, Gistbrocades Company), em uma BOD a 37º por 3 horas. O material foi transferido para um almofariz de 6 cm de diâmetro, completando-se o volume até 5 ml, com água destilada e macerando-se a suspensão com um pistilo até total desintegração (Sousa, 1997). O material macerado foi transferido para uma proveta e o volume completado para 30 ml com água destilada. Esperou-se 3 minutos para sedimentação das partículas mais pesadas e foram retiradas alíquotas para contagem dos endósporos em câmara de Newbauer. Considerando-se as diluições realizadas, o formulado final continha 2×10^8 endósporos /g de pó de raiz.

3) Instalação dos ensaios em casa de vegetação

3.1) Primeiro ensaio

Esse ensaio foi instalado em delineamento de blocos ao acaso com 16 tratamentos e 10 repetições, compreendendo um total de 160 vasos, sendo que as testemunhas (sem a bactéria) foram colocadas em outro compartimento da casa de vegetação para evitar contaminação com *P. penetrans*. A descrição detalhada dos tratamentos encontra-se no Tabela 1.

O substrato utilizado para a produção de mudas de alface foi o Plant Max-Hortaliças, com casca processada e enriquecida, vermiculita expandida e turfa processada e enriquecida em sua composição. Para preparação das mudas, foram utilizadas 3 bandejas de isopor com 64 células cada, e as células com capacidade de 16g de substrato. A primeira bandeja foi preparada separadamente com as testemunhas, que receberam o substrato e sementes das cultivares de alface lisa 'Karla' e alface crespa 'Hortência'. A segunda e a terceira bandejas foram preparadas com substrato tratado com o formulado B4 de *P. penetrans*, de maneira a obterem-se as concentrações de 10^5 e 10^6 endósporos da bactéria/g de substrato. O substrato e as duas concentrações do formulado foram homogeneizados em sacos plásticos, e em seguida, foram preenchida as células da bandeja para realização da semeadura com 2 sementes por célula e posterior desbaste, restando 1 muda/célula.

Foram colocadas bandejas coletoras para a recuperacão da água perdida pela

irrigação sob as sementeiras tratadas com *P. penetrans*, com objetivo de avaliar possíveis perdas de endósporos por lixiviação. Dessas bandejas foram recolhidas amostras de água, após 12 dias da semeadura e realizadas contagens de endósporos em câmara de Newbauer. Com 10cm de altura, as mudas de alface com o substrato aderido (uma por vaso) foram transplantadas, para vasos de 3 litros com solo esterilizado. Vinte dias após, as plântulas foram inoculadas com 5000 ovos de *M. javanica* /planta.

O substrato utilizado para transplantar as mudas foi previamente preparado com uma mistura de solo com areia média lavada (42 % de argila, 0,0 % de Silt e 58% de areia), acrescida de esterco de gado (18 L), casca de arroz queimada (12 L), superfosfato simples (8L) e calcário dolomítico (1Kg) e 500 g de micronutrientesFTE, sendo esterilizado a 100°C por 1 hora. O resultado da análise química desse substrato foi a seguinte: pH em água: 5,85 ml/100cc; Ca + Mg: 2,75 mg/l; P: 1,54 mg/l; K: 143,5 mg/l; H: 1,51 mg/kg; M.O: 2,25% e S: 58,18 mg/kg.

Sessenta e cinco dias após o transplantio, foi realizada a avaliação do primeiro ensaio, sendo feita a colheita da parte aérea, cortando-se as folhas da alface 3 a 4cm do solo. Foram feitas também as avaliações dos tratamentos ímpares (Tabela 1: raízes removidas), quanto a infecção causada pelo nematóide e quanto à supressividade induzida pela bactéria (ítem 4). Nos demais tratamentos, os pares, as raízes foram incorporadas ao solo, sendo feitas avaliações somente por ocasião do segundo ensaio.

Tabela 1: Descrição dos tratamentos do primeiro e segundo ensaios

Tratamentos	Descrição dos Tratamentos
Testemunha 1	Alface lisa cv. Karla inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes removidas do solo no primeiro ensaio.
Testemunha 2	Alface lisa cv. Karla inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes incorporadas ao solo no primeiro ensaio.
Testemunha 3	Alface crespa cv. Hortência inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes removidas do solo no primeiro ensaio.
Testemunha 4	Alface crespa cv. Hortência inoculadas com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes incorporadas ao solo no primeiro ensaio.
Tratamento 5	Alface lisa cv. Karla tratada com 10^5 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato e inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes removidas do solo no primeiro ensaio.
Tratamento 6	Alface lisa cv. Karla tratada com 10^5 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato e inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes incorporadas ao solo no primeiro ensaio.
Tratamento 7	Alface crespa cv. Hortência tratada com 10^5 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato e inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes removidas do solo no primeiro ensaio.
Tratamento 8	Alface crespa cv. Hotência tratada com 10^5 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato e inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes incorporadas ao solo no primeiro ensaio.
Tratamento 9	Alface lisa cv. Karla tratada com 10^6 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato e inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes removidas do solo no primeiro ensaio.
Tratamento 10	Alface lisa cv. Karla tratada com 10^6 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato e inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com suas raízes incorporadas ao solo no primeiro ensaio.
Tratamento 11	Alface crespa cv. Hortência tratada com 10^6 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato e inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com suas raízes removidas do solo no primeiro ensaio.
Tratamento 12	Alface crespa cv. Hortência tratada com 10^6 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato e inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes incorporadas ao solo no primeiro ensaio.
Tratamento 13	Alface lisa cv. Karla tratadas com 10^6 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato, inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com as raízes removidas do solo no primeiro ensaio e submetidas ao pousio de 60 dias .
Tratamento 14	Alface lisa cv. Karla tratadas com 10^6 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato, inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com suas raízes incorporadas ao solo no primeiro ensaio e submetidas ao pousio de 60 dias.

Continua ...

Continuação da Tabela 1 ...

Tratamentos	Descrição dos Tratamentos
Tratamento 15	Alface crespa cv. Hortênsia tratadas com 10^6 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato, inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com suas raízes removidas do solo no primeiro ensaio e submetidas ao pousio de 60 dias.
Tratamento 16	Alface crespa cv. Hortênsia tratadas com 10^6 esporos de <i>P. penetrans</i> /g de substrato, inoculada com 5000 ovos de <i>M. javanica</i> , com suas raízes incorporadas ao solo no primeiro ensaio e submetidas ao pousio de 60 dias.

3.2) Segundo ensaio

Este ensaio foi montado em seqüência ao primeiro, sete dias após a colheita da alface, constando dos mesmos tratamentos do Tabela 1. As mudas de tomate cv. Santa Cruz, susceptíveis a *M. javanica*, foram produzidas em sementeiras e transplantadas, com 20 dias após a semeadura, quando apresentavam aproximadamente 12 cm de altura. Todos os vasos receberam 1 planta. O delineamento experimental foi o mesmo, blocos ao acaso, com 16 tratamentos e 10 repetições. Foram acrescidas neste segundo ensaio, as avaliações dos tratamentos pares (Tabela 1), ou seja, aqueles em que as raízes foram incorporadas ao solo por ocasião do primeiro ensaio. Após 90 dias, realizou-se a colheita do experimento. Os vasos que corresponderam aos tratamentos 13, 14, 15 e 16, foram mantidos em pousio, após a colheita da alface, permanecendo durante 60 dias sem plantas e sem irrigação. Somente após esse intervalo, mudas de tomate foram previamente preparada em sementeiras e transplantadas uma por vaso. Os tratamentos submetidos ao pousio foram avaliados 90 dias após o transplante dos tomateiros, sendo as avaliações feitas 60 dias após aos outros tratamentos do segundo ensaio.

4) Parâmetros avaliados no primeiro e segundo ensaios

4.1- Peso fresco das plantas de alface e frutos de tomate

No primeiro ensaio foram pesadas as plantas de alface, que foram cortadas na altura de 3 a 4 cm acima do solo. No segundo ensaio avaliou-se o peso dos tomates produzidos nos diferentes tratamentos. As médias foram avaliadas e comparadas com os respectivos tratamentos pelo sistema SAS System 6.10 com aplicação do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2-Níveis de infecção de raízes e infestação do solo por *M. javanica*:

4.2.1) Raízes

Inicialmente as raízes de alface e tomateiro coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos, individualizados e etiquetados, sendo posteriormente lavadas e pesadas. Em seguida, as raízes foram coradas com 15 mg de Floxina B/ litro de água (Hartman & Sasser, 1985), sendo mergulhadas no corante por de 15 a 20 minutos, para facilitar a visualização das massas de ovos e para posterior contagem. Foi estabelecido o índice de galhas (IG) ou de massas de ovos (IMO) de acordo com Taylor & Sasser (1978).

A seguir, foi realizada a extração de ovos pelo método de Hussey & Barker (1973) de todos os sistemas radiculares, utilizando-se hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1%. No caso da alface, as raízes foram colocadas em erlenmyers, os quais foram fechados com parafilme e colocados em um agitador por 5 minutos a 3000 rpm. Após a agitação, a suspensão de ovos e raízes foi passada através de peneiras de 50 e 500 mesh, respectivamente, sendo os ovos recolhidos nesta última, transferidos para frascos de vidro de 100 ml e fixados com formol, de maneira que a suspensão final ficasse na concentração de 2%. As raízes lavadas que ficaram na peneira de 50 mesh, voltaram para sacos plásticos etiquetados, sendo congeladas para posterior avaliação do numero de fêmeas infectadas por *P. penetrans* conforme descrito anteriormente.

Para as raízes de tomateiro, primeiramente, separou-se uma alíquota de 0,5 gramas que foi congelada para a avaliação das fêmeas infectadas. A seguir, procedeu-se a extração e fixação dos ovos, porém, as raízes foram trituradas com NaOCl a 1% em liqüidificador por 15–30 segundos e a suspensão vertida em peneiras de 50 e 500 mesh. Posteriormente, os ovos fixados com formol a 2 % foram contados em lâminas de Peters (três repetições), sendo avaliado o número total de ovos/sistema radicular.

4.2.2) Solo

As amostras de solo coletadas nos vasos de cada tratamento foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados e armazenados em câmara fria a 10°C. Após 2 dias, as amostras foram homogeneizadas, retirando-se uma

alíquota de 200 ml de solo/repetição, que foi processada pela técnica de Jenkins (1964). Após a extração, os nematóides foram fixados e contados, usando-se a mesma técnica empregada para os ovos no item anterior .

4.2.3) Número total de nematóides

O número total de nematóide foi calculado somando-se o número de ovos no sistema radicular com o número de J2/3 L de solo. Posteriormente, foi calculado o fator de reprodução (FR): População final (ovos + J2) / População Inicial (5000 ovos).

4.3) Grau de supressividade induzido pela bactéria:

No estudo da infectividade induzido pela bactéria *P. penetrans* a *M. javanica*, foram feitas avaliações do número de fêmeas infectadas, número de J2 infectados e o número médio de endósporos aderidos/J2.

4.3.1) Número de fêmeas infectadas

As raízes de alface e de tomateiro contendo fêmeas de *M. javanica*, congeladas a -10 °C foram colocadas em enemeyer, com capacidade de 500 mL, onde permaneceram por dois dias imersas em uma solução de pectinase, a 50% a 27°C sob agitação. Após este período, as raízes foram separadas da solução e batidas por 10 segundos em liqüidificador, com as pás revestidas com parafilme, na rotação mínima. As fêmeas foram recolhidas em peneira de 100 mesh e dispostas, individualmente, em lâminas, contendo gotas de água e cobertas com lamínula. Foram avaliadas 30 fêmeas por repetição. Essas fêmeas foram observadas ao microscópio ótico e registrado o número de fêmeas infectadas por *P. penetrans* e a seguir calculada a percentagem de fêmeas infectadas. Foram consideradas infectadas, as fêmeas que apresentavam endósporos, ou qualquer outra fase do ciclo da bactéria no interior do corpo.

4.3.2 - Número de J2 de *M. javanica* infectados por *P. penetrans*

De cada amostra de 50 mL fixada em formol, retirou-se uma alíquota que foi colocada em uma lâmina de Peters para contagem do número de J2 com esporos aderidos em 1 mL de suspensão. Fizeram-se três contagens, obtendo-se o valor médio do número de J2 infectados .

4.3.3. Número de endósporos de *P. penetrans* aderidos por J2 de *M. javanica*

Foram capturados 10 J2 em cada repetição (10 repetições), que foram dispostos em lâminas e avaliados, individualmente, ao microscópio invertido, quanto ao número de endósporos aderidos/J2.

5) Análise estatística dos dados

Os valores do peso da parte área da alface, dos frutos de tomate e os níveis populacionais de *M. javanica*, foram inicialmente submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo sistema SAS System 6.10, com aplicação do Teste de Tukey ($P \leq 0,05$), sendo o delineamento de blocos ao acaso com 16 tratamentos e 10 repetições.

O grau de supressividade induzido pela bactéria (percentagem de fêmeas infectadas, percentagem de J2 infectados e número de esporos aderidos/100 J2) foram submetidos a análise de c^2 ($P \leq 0,05$) para comparação dos tratamentos.

Resultados e Discussão

1) Avaliação da perda de endósporos nas mudas

Por ocasião da produção de mudas de alface, foram avaliadas as amostras da água de irrigação de 150 mudas tratadas com *Pasteuria penetrans*, coletadas pelas bandejas dispostas sob as sementeiras tratadas com as doses da bactéria 10^5 e 10^6 endósporos/g de substrato. A avaliação mostrou uma perda de endósporos da bactéria por lixiviação de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ endósporos após 12 dias de irrigação dessas mudas tratadas, perfazendo uma perda estimada de 10^3 endósporos/muda. Essa observação foi realizada com base no acúmulo de endósporos coletados durante esse período. Acredita-se que essa perda de endósporos tenha ocorrido sobretudo devido a textura grosseira do substrato. Oostendorp e colaboradores (1990), observaram também que devido ao tamanho diminuto de *P. penetrans*, endósporos dessa bactéria são facilmente carregados pela água em percolação no solo, sobretudo em solos arenosos. Recomenda-se que em ensaios futuros *P. penetrans* seja aplicada diretamente no sulco de plantio, ou outros substratos para mudas de hortaliças sejam testados.

2) Primeiro ensaio

Foram avaliados no primeiro ensaio os oito tratamentos que tiveram as suas raízes removidas do solo (Tabela 1). Observou-se a partir do índice de galhas (IG) e índice de massas de ovos (IMO), a ocorrência de uma leve redução da infestação dos nematóides, para os tratamentos 10^6 endósporos/g de substrato (Tabela 2). Entretanto, essa redução não foi confirmada pelos valores do números de ovos e juvenis de segundo estádio (J2), que não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O mesmo ocorreu com os fatores de reprodução que variaram de 2,08 a 2,92 para os diferentes tratamentos. Não ocorreu diferença estatística nas populações de *M. javanica* nas cultivares de alface lisa 'Karla' e cresa 'Hortência', que a princípio foram consideradas suscetíveis e moderadamente resistentes, respectivamente, de acordo com os trabalhos de Charchar *et al.* (1996) e Carneiro *et al.* (2000). Ambas as cultivares tiveram comportamento semelhante com fatores de reprodução muito próximos. Eses resultados contrariam as observações feitas por esses dois últimos autores que mostraram que as alfaces crespas são mais resistentes que as alfaces lisas, embora neste ensaio não tenham sido usadas exatamente as mesmas cultivares estudadas por esses autores.

As duas doses de *P. penetrans* 10^5 e 10^6 esporos/g de substrato também não tiveram nenhuma influência nas populações do nematóide, 65 dias após a inoculação. A barreira exercida pelos esporos da bactéria veiculados nas mudas não foi eficiente para deter a penetração dos J2 e a consequente reprodução do nematóide. Dessa maneira, observou-se que o controle exercido por *P. penetrans* não foi eficiente no primeiro ciclo do nematóide. Eses resultados estão de acordo com Sharma & Gomes (1999), que num ensaio realizado em casa de vegetação com feijoeiro, verificaram que *P. penetrans* não se mostrou eficiente no controle de *M. arenaria* na primeira avaliação, 77 dias após a aplicação da bactéria. A não eficiência da bactéria logo no primeiro ciclo do nematóide foi ressaltada por Mankau (1980) que mostrou que populações de *Meloidogyne* spp. tratadas com *P. penetrans* aproximaram-se da extinção após 4 a 5 gerações com tomates cultivados em vasos. Channer & Gowen (1988) mostraram também, que a aplicação de endósporos de *P. penetrans* resultou em controle significativo do nematóide das galhas em tomate, somente após algumas gerações.

Quanto a produtividade da alface (Tabela 2) pode-se observar que a alface cresa

'Hortência' foi significantemente mais produtiva que a lisa 'Karla' (exceto no tratamento 10^6 pousio) devido provavelmente a características inerentes à cultivar, uma vez que a população de nematóides foi praticamente a mesma nos diferentes tratamentos.

Tabela 2. Efeito de duas doses da bactéria *Pasteuria penetrans* (10^5 e 10^6 endósporos / g de substrato) veiculado nas mudas no controle de *Meloidogyne javanica* e no peso da parte aérea de duas cultivares de alface: lisa 'Karla' e crespa 'Hortência'.

Tratamentos (a)	IG (b)	IMO (b)	Número de ovos + J2 (c)	FR (d)	Peso da parte aérea em gramas (e)
Testemunha lisa (1)	4,4	4,0	10.413,80 a	2,08	298,42 b
Testemunha crespa (3)	4,0	4,0	12.003,12 a	2,20	402,50 a
Bactéria 10^5 lisa (5)	4,0	4,0	13.228,73 a	2,65	243,59 b
Bactéria 10^5 crespa (7)	4,0	4,0	14.630,00 a	2,92	324,84 ab
Bactéria 10^6 lisa (9)	3,5	3,8	14.183,82 a	2,84	262,70 b
Bactéria 10^6 crespa (11)	3,6	2,5	12.413,20 a	2,48	303,82 ab
Bactéria 10^6 lisa/pousio (13)	3,7	3,2	13.223,40 a	2,64	272,8 b
Bactéria 10^6 crespa/pousio (15)	3,2	2,3	12.429,80 a	2,49	277,06 b

(a) Descrição dos tratamentos, vide Tabela 1.

(b) Índice de galhas (IG) e massas de ovos (IMO) baseados na escala de (Taylor & Sasser, 1978)

(c) Os valores são a média de 10 repetições, tendo sido transformados em $\log_{10}(x + 1)$. Valores seguidos das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

(d) Fator de reprodução: população final de nematóides/população inicial

(e) Valores seguidos das mesmas letras não diferem entre si ($P \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

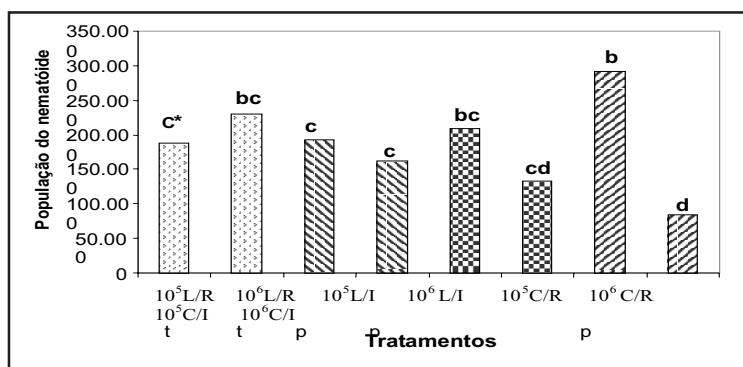


Figura 1- Efeito de duas doses 10^5 e 10^6 endósporos de *Pasteuria penetrans*/g de substrato, aplicadas em alface (L) e crespa (C) cujas raízes foram removidas (R) ou incorporadas (I), na população de *Meloidogyne javanica* (nº. total de ovos + J2) em cultura subsequente de tomateiro.

* Colunas com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Descrição detalhada dos tratamentos, vide Quadro 1

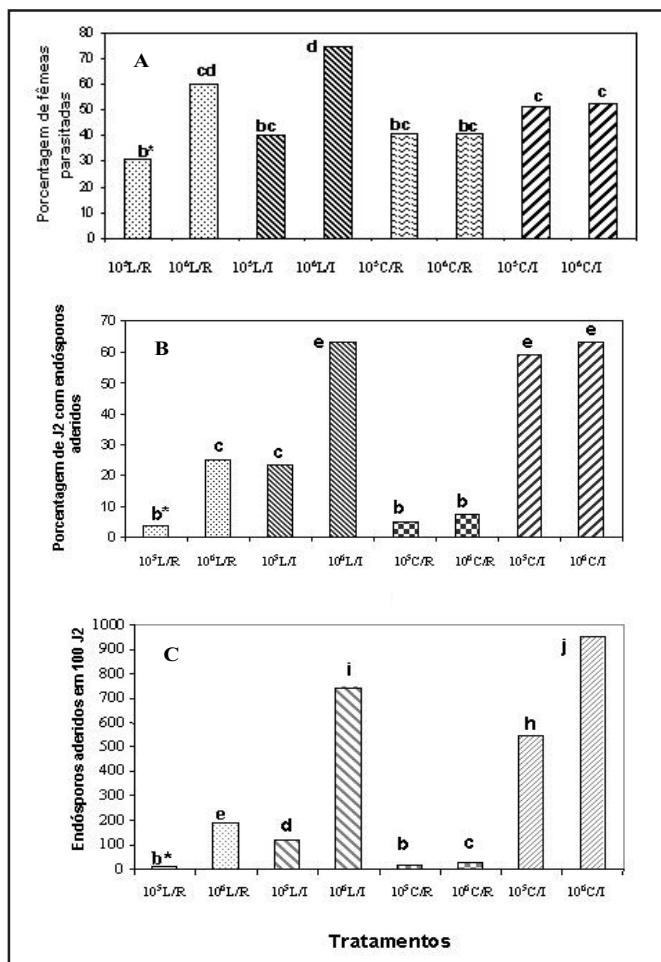


Figura 2- Efeito de duas doses 10^5 e 10^6 endósporos de *Pasteuria penetrans/g* de substrato, aplicadas em alfaces lisa(L) e cresa(C) cujas raízes foram removidas(R) ou incorporadas(I) na população de *Meloidogyne javanica*, em cultura subsequente de tomateiro: A: Porcentagem de fêmeas parasitadas ; B: Porcentagem de juvenis de segundo estádio (J2) com endósporos aderidos e C: Número médio de endósporos aderidos em 100 J2.

* Colunas com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Descrição detalhada dos tratamentos vide Quadro 1

O grau de supressividade induzido pela bactéria foi medido através da porcentagem de fêmeas infectadas pela bactéria, porcentagem de J2 com esporos aderidos e número médio de endósporos aderidos/100J2 (Tabela 3). Em todos os tratamentos com a bactéria foram encontradas fêmeas de *M. javanica* parasitadas por *P. penetrans* e J2 com esporos aderidos, mostrando que embora a bactéria não tenha exercido um nível eficiente de controle (Tabela 2), a sua presença ficou bem evidente nos diferentes tratamentos (Tabela 3). A dose 10^6 endósporos/g de substrato foi显著antemente superior à dose 10^5 quanto a percentagem de fêmeas infectadas, percentagem de J2 com esporos aderidos e número médio de esporos aderidos em 100 J2 (Tabela 3). Embora o grau de supressividade ainda esteja baixo neste primeiro ensaio, mesmo na concentração 10^6 (média de 2,36-4,44 esporos/J2 em 30 – 45% de J2 infectados), a tendência seria a de ocorrer um aumento na próxima geração devido ao número de fêmeas infectadas no primeiro ensaio (33,3 – 56,6 %). A perda significativa da concentração de endósporos (10^3) da bactéria nas mudas por lixiviação interferiram significativamente no grau de supressividade no primeiro ensaio. O baixo parasitismo da bactéria nos J2 (Tabela 3) pode ser explicado pelas observações feitas por Brown & Smart (1985) e Davies *et al.* (1988) que mostram que o processo de infecção da população de nematóides por *P. penetrans* no solo se dá em duas fases, na primeira o número de endósporos no solo é suficiente para aderir a um certo número de juvenis, porém em número baixo. Na segunda fase, as fêmeas que não produziram ovos e que entram em senescência podem produzir cerca de 2 milhões de endósporos/fêmea em média que são liberados no solo e vão aderir aos J2 na geração seguinte. Em microparcelas infestadas experimentalmente com *M. arenaria* e *Pasteuria* sp., Oostendorp *et al.* (1991) observaram um aumento significativo da densidade populacional da bactéria após dois anos de plantios com culturas anuais. Stirling e White (1982) sugeriram que *P. penetrans* necessita de vários anos para elevar a densidade de inóculo em solo cultivado com videiras. No sul da Austrália, Stirling e White (1982) detectaram um decréscimo na população de juvenis de segundo estádio de *M. incognita* causado por *P. penetrans* em vinhedos com idade superior a 10 anos, demonstrando uma certa demora para que a bactéria atinja uma concentração no solo, capaz de controlar altas densidade populacionais de *Meloidogyne* spp.

Tabela 3. Supressividade induzida pela bactéria *Pasteuria penetrans* a fêmeas e juvenis de segundo estádio (J2) de *Meloidogyne javanica* em alface lisa cv. Karla e crespa cv. Hortência.

Tratamentos (a)	% de Fêmeas Parasitadas (b)	% de J2 com Esporos Aderidos (b)	Número Médio de Esporos Aderidos em 100 J2 (b)
Testemunha lisa (1)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Testemunha crespa (3)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Bactéria 10 ⁵ lisa (5)	10,0 ^b	0,9 ^b	0,9 ^b
Bactéria 10 ⁵ crespa (7)	13,3 ^b	4,8 ^b	7,6 ^c
Bactéria 10 ⁶ lisa (9)	56,6 ^d	38,8 ^{cd}	236,9 ^d
Bactéria 10 ⁶ crespa (11)	33,3 ^c	30,6 ^c	273,6 ^d
Bactéria 10 ⁶ lisa/pousio (13)	44,4 ^{cd}	40,0 ^{cd}	444,4 ^e
Bactéria 10 ⁶ crespa/pousio (15)	40,0 ^{cd}	45,0 ^d	425,0 ^e

(a) Descrição dos tratamentos, vide Tabela 1

(b) Os valores são médias de 10 repetições. Valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste χ^2 ($P \leq 0,05$),

3) Segundo ensaio

Foram avaliados os 16 tratamentos (Tabela 1), incluindo aqueles com raízes de alface incorporadas. Pode-se observar pela Tabela 4 que não houve diferença entre o índice de galhas (IG) e o índice de massas de ovos (IMO) dos diferentes tratamentos, mostrando que todos os tratamentos com a bactéria apresentaram infestações muito altas de *M. javanica*, com mais de 100 galhas ou massas de ovos por sistema radicular. Entretanto, o número total de ovos + J2 mostrou diferença entre as testemunhas e todos os tratamentos com *P. penetrans*, evidenciando que a bactéria, independente da dose introduzida através das mudas de alface, foi capaz de reduzir, na ordem de 10 vezes, a população de *M. javanica* na cultura do tomateiro, altamente suscetível a essa espécie de nematóide. Pode-se notar nitidamente essa redução, quando calcularam-se os fatores de reprodução (Tabela 4) para as testemunhas (229,04 - 274,41) em comparação com os tratamentos com *P. penetrans* (16,44 - 62,52). Segundo Sharma & Gomes (1999), o fator mais importante, no controle biológico de *Meloidogyne* spp. com *P. penetrans* é a não dependência da aplicação de altas doses iniciais da bactéria. Considerando que as condições edafoclimáticas do Brasil são altamente favoráveis à bactéria, altas doses iniciais de *P. penetrans* não são necessárias para o controle do nematóide das galhas, como foi evidenciado nos EUA para *M. arenaria* por Chen *et al.* (1996), que considerou a atuação da bactéria ao longo do tempo.

Vários autores observaram um controle populacional significativo de *Meloidogyne* spp. com *P. penetrans* na cultura do tomateiro (Channer & Gowen, 1988; Bird & Brisbane, 1988; Minton & Sayre, 1989; Sekhar & Gill, 1990; Ahmed & Gowen, 1991; Sharma, 1992.). Entretanto, o controle efetivo da bactéria já no primeiro ciclo da cultura dependeu de altas doses iniciais. Segundo Chen *et al.* (1996), a concentração mínima de esporos necessária para suprimir altas populações de *M. arenaria* raça1 no primeiro ano, em plantios de amendoim na Flórida foi de 10^4 endósporos/g de solo. Considerando-se as perdas que ocorreram por lixiviação dos endósporos, por ocasião das produção das mudas de alface, pode-se considerar que as doses usadas neste ensaio foram baixas (10^2 e 10^3 endósporos/g de substrato).

Embora o controle exercido pela bactéria tenha sido significativo (Tabela 4), o nível populacional de *M. javanica* nas plantas tratadas com *P. penetrans* foi ainda muito alto, demonstrando que os níveis de *P. penetrans* no solo ainda estão baixos (Tabela 5). O controle efetivo do nematóide por *P. penetrans* ocorre quando o número de endósporos da bactéria no solo já se encontra alto e, por consequência, muitos endósporos aderem-se aos J2. Desta forma, a motilidade dos juvenis é muito reduzida, e estes não conseguem deslocar-se até as raízes das plantas hospedeiras para infectá-las (Mankau & Prasad, 1977; Stirling, 1984). Quando isto ocorre, considera-se que o solo tornou-se supressivo e a população do nematóide tende a cair significativamente (Freitas, 1997). Tal supressividade pode ser induzida pelo plantio sucessivo de culturas hospedeiras do nematóide, onde *P. penetrans* tenha boa reprodutividade (Oostendorp *et al.*, 1991).

Pode-se observar também que não houve nenhuma influência das cultivares da cultura anterior de alface nas populações do nematóide no tomateiro (Tabela 4). Isso já era esperado uma vez que as alfaces lisa e crespa se comportaram de maneira semelhante no primeiro ensaio. Não houve também influência da incorporação no solo das raízes de alface no nível populacional de *M. javanica* na testemunha (Tabela 4). Esse fato pode ser explicado pelo grande número de J2 presentes no solo por ocasião da retirada da cultura da alface, quando comparados ao número de ovos do sistema radicular.

Comparando-se os mesmos tratamentos, dois a dois, com *P. penetrans* com raízes removidas e incorporadas (Tabela 4), pode-se observar para todos os tratamentos com bactéria na concentração 10^6 endósporos/g de substrato, o nível populacional de *M. javanica* e os fatores de reprodução foram significativamente inferiores nos

tratamentos com raízes incorporadas, mostrando que o inóculo residual da bactéria 10^6 trazido pelas raízes, foi de grande importância para o aumento do controle realizado pela bactéria. Resultados semelhantes foram obtidos por Ahmed (1990) que observou uma redução significativa de galhas e massas de ovos de *M. incognita* em culturas sucessivas de tomate, beringela e trigo, com reincorporação das raízes infestadas por *P. penetrans*. No caso da dose 10^5 não houve praticamente diferença entre os tratamentos com raízes retiradas e incorporadas (Tabela 4), mostrando que o efeito residual da bactéria nas raízes incorporadas não diminui significativamente as populações do nematóide na segunda cultura do tomateiro.

Quando se analisa sob outro aspecto o efeito da incorporação ou não das raízes da

Tabela 4. Efeito residual de duas concentrações da bactéria *Pasteuria penetrans* (10^5 e 10^6 endósporos por grama de substrato) no controle populacional de *Meloidogyne javanica* no segundo ensaio e na produtividade da cultura do tomateiro cv. Santa Cruz

TRATAMENTOS (a)	IG (b)	IMO (b)	Número total de ovos +J2 (c)	FR (d)	Peso dos frutos em gramas (e)
Testemunha lisa/retirada (1)	5	5	1.145.217,14 a	229,04	32,43 ab
Testemunha lisa/incorporada (2)	5	5	1.226.287,55 a	245,25	35,88 ab
Testemunha crespa/retirada (3)	5	5	1.372.062,04 a	274,41	31,59 ab
Testemunha crespa/incorporada (4)	5	5	1.305.439,03 a	261,08	44,56 a
Bactéria 10^5 . lisa/retirada (5)	5	5	188.368,44 c	37,20	45,44 a
Bactéria 10^5 lisa/incorporada (6)	5	5	193.368,47 c	38,63	32,99 ab
Bactéria 10^5 crespa/retirada (7)	5	5	209.433,43 bc	41,88	36,14 ab
Bactéria 10^5 crespa/incorporada (8)	5	5	291.830,26 b	58,36	35,65 ab
Bactéria 10^6 lisa/retirada (9)	5	5	230.425,81 bc	46,08	30,29 ab
Bactéria 10^6 lisa/incorporada (10)	5	5	161.486,38 c	32,29	38,77 ab
Bactéria 10^6 crespa/retirada (11)	5	5	133.500,25 cd	26,70	32,52 ab
Bactéria 10^6 . crespa/incorpotada (12)	5	5	84.279,07 d	16,85	34,69 ab
Bactéria 10^6 lisa/retirada/pousio (13)	5	5	284.896,04 b	56,97	27,80 b
Bactéria 10^6 lisa/incorp./pousio (14)	5	5	114.447,86 cd	22,88	44,95 a
Bactéria 10^6 crespa/retir./pousio (15)	5	5	312.624,06 b	62,52	19,00 c
Bactéria 10^6 crespa/incorp./pousio (16)	5	5	82.235,08 d	16,44	26,05 b

(a) Descrição dos tratamentos vide Tabela 1

(b) Índice de galhas (IG) e massas de ovos (IMO) baseados na escala de Taylor & Sasser (1978)

(c) Os valores são a média de 10 repetições, tendo sido transformados em $\log_{10}(x + 1)$ para a análise estatística. Valores seguidos das mesmas letras não diferem entre si ($P \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

(d) Fator de reprodução: população final de nematóides/população inicial

(e) Valores seguidos das mesmas letras não diferem entre si ($P \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

alface (Tabela 5), comparando-se os mesmos tratamento, dois a dois, pode-se observar que o nível de supressividade induzido pela bactéria, ou seja, porcentagem de fêmeas infectadas, porcentagem de J2 com esporos aderidos e número médio de esporos aderidos em 100 J2, aumentam nitidamente nos tratamentos com as raízes incorporadas nas duas concentrações de *P. penetrans*. Estes resultados demonstraram que através de plantios sucessivos e incorporação do sistema radicular houve um crescimento do inóculo da bactéria e esses resultados concordam mais uma vez com os observados por Ahmed (1990).

Tabela 5. Parasitismo induzido pela bactéria *P. penetrans* em fêmeas e juvenis de segundo estádio (J2) de *Meloidogyne javanica* no segundo ensaio em tomateiro cv. Santa Cruz.

Tratamentos (a)	% de fêmeas parasitadas (b)	% de J2 com esporos aderidos (b)	Número médio de esporos aderidos em 100 J2 (b)
Testemunha lisa/retirada (1)	0 a	0a	0a
Testemunha lisa/incorporada (2)	0 a	0a	0a
Testemunha crespa/retirada (3)	0 a	0a	0a
Testemunha crespa/incorporada (4)	0 a	0a	0a
Bactéria 10^5 lisa/retirada (5)	30,6 b	3,5 b	11,3 b
Bactéria 10^5 lisa/incorporada (6)	40,2 bc	23,3 c	120,8 d
Bactéria 10^5 crespa/retirada (7)	40,4 bc	5,0 b	14,2 b
Bactéria 10^5 crespa/incorporada (8)	51,3 c	59,2 e	549,2 h
Bactéria 10^6 lisa/retirada (9)	60,2 cd	25,0 c	190,8 e
Bactéria 10^6 lisa/incorporada (10)	74,4 d	63,2 e	745,0 i
Bactéria 10^6 crespa/retirada (11)	40,5 bc	7,5 b	31,7 c
Bactéria 10^6 crespa/incorporada (12)	52,4 c	63,2 e	951,7 j
Bactéria 10^6 lisa/retirada/pousio (13)	46,6 bc	5,5 b	100,0 d
Bactéria 10^6 lisa/incorp/pousio (14)	58,4 c	48,3 d	321,7 h
Bactéria 10^6 cv. crespa/retir/pousio (15)	43,3 bc	6,5 b	130,2 d
Bactéria 10^6 cv. crespa/incorp/pousio (16)	55,2 c	45,0 d	451,7 g

(a) Descrição dos tratamentos vide Tabela 1

(b) Os valores são médias de 10 repetições. Valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste χ^2 ($P \leq 0,05$).

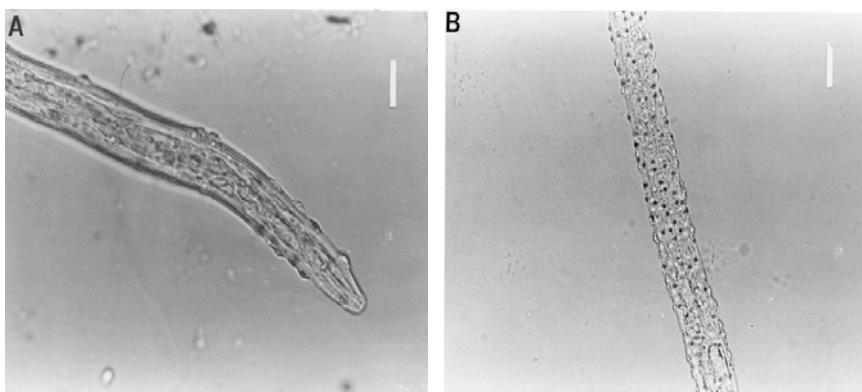


Figura 3. Fotomicrografia de juvenis de segundo estádio (J2) de *Meloidogyne javanica* com endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos. A) região anterior dos J2 com alguns endósporos. B) região mediana do corpo com muitos endósporos. Barra = 10mm.

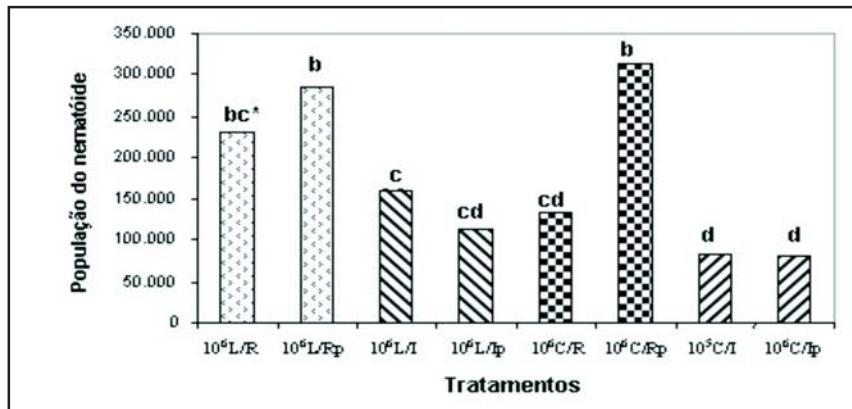


Figura 4 - Efeito do pousio (p) na dose 10^6 endósporos de *Pasteuria penetrans*/g de substrato, aplicada em alface lisa(L) e crespa(C) cujas raízes foram removidas (R) ou incorporadas (I) no solo, na população de *Meloidogyne javanica* em cultura subsequente de tomateiro.

*Colunas com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Descrição detalhada dos tratamentos vide Quadro 01.

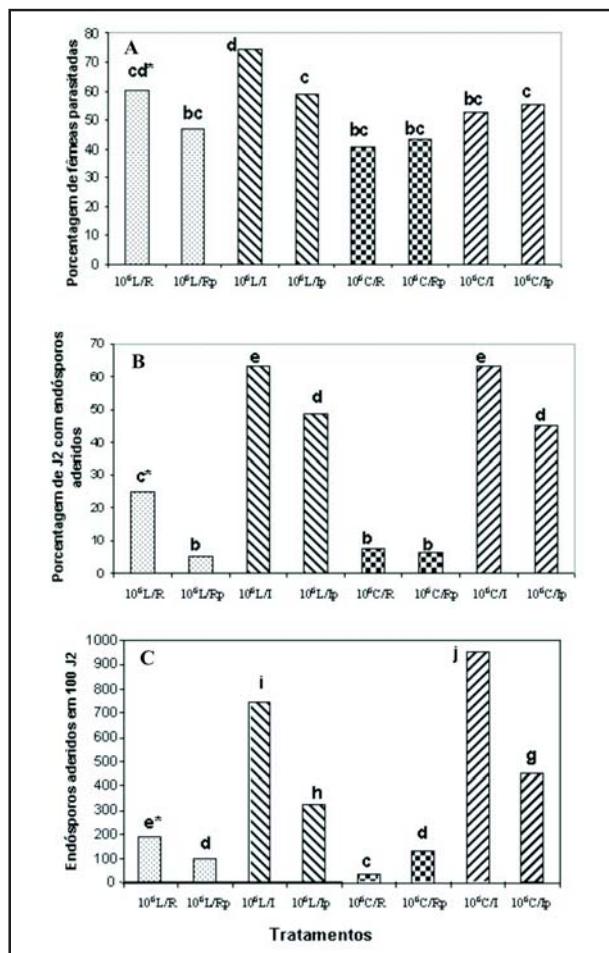


Figura 5 - Efeito do pousio (p) na dose 10^6 endósporos de *Pasteuria penetrans*/g de substrato aplicada em alface lisa (L) e crespa (C) cujas raízes foram removidas (R) ou incorporadas (I) no solo, no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em cultura subsequente de tomateiro: A: Porcentagem de fêmeas parasitadas; B: Porcentagem de juvenis de segundo estádio (J2) com endósporos aderidos e C: Número médio de endósporos aderidos em 100 J2.

*Colunas com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Descrição detalhada dos tratamentos vide Quadro 1.

Comparando-se as diferentes doses nos mesmos tratamentos dois a dois (Figura. 1) pode-se observar que a dose 10^6 esporos /g de substrato foi mais eficiente na redução dos níveis populacionais de *M. javanica* em todos os tratamentos, exceto para a alface lisa cujas raízes foram removidas do solo. Esses resultados estão de acordo com as observações feitas por Chen *et al.* (1996) que mostram que quanto mais concentrada a dose, maior o efeito sobre a população dos nematóides já no primeiro ano. Doses da ordem 10^4 esporos /g de solo mostraram efeito positivo a partir do segundo ano e doses menores , da ordem de 10^3 mostraram efeito quanto ao controle no terceiro ano. Dickson e colaboradores (1994) só observaram reduções na população de *M. arenaria* em amendoim em microparcelas no campo, a partir de dois anos da inoculação. Considerando-se que o período total destes dois ensaios (alface e tomateiro) foi de aproximadamente 200 dias, os níveis de controle não foram efetivos quanto aos encontrados pelos autores acima mencionados. Comparando-se as doses quanto ao nível de parasitismo exercido pela bactéria (Fig. 2A-C), ou seja, porcentagem de fêmeas infectadas, porcentagem de juvenis com esporos aderidos e número médio de esporos aderidos em 100 J2, pode-se observar que o efeito da dose foi igual ou significativamente superior na dose e 10^6 para os três parâmetros. O número médio de esporos aderidos /J2 tem sido relacionado ao número de endósporos presentes no solo, sendo o parâmetro mais indicado para medir o grau de supressividade de um solo (Freitas *et al.*, 2000). Esse parâmetro tem sido relacionado também à redução de infectividade dos J2 nas raízes: J2 com número igual ou maior a 15 endósporos reduzem a porcentagem de penetração nas raízes de 86% (Davies *et al.*, 1988 b).

Em algumas amostras dos tratamento com a dose 10^6 endósporos de bactéria, foram encontrados alguns nematóides totalmente deformados devido a alta quantidade de endósporos aderidos à sua cutícula, aproximadamente 90 endósporos, conforme mostra a Figura 3B. Juvenis de segundo estádio com elevado número de endósporos aderidos à cutícula, em geral, não penetram nas raízes e se conseguem penetrar produzirão fêmeas que não produzirão ovos (Brown & Smart, 1985; Davies *et al.*, 1988; Stirlring, 1984; e Stirlring *et al.* 1990).

Quanto aos tratamentos com pousio, os resultados não foram conclusivos (Figura 4). Nos tratamentos com 10^6 esporos/g de substrato com alfaces lisa e crespa com sistema radicular removido, ocorreu aumento populacional de *M. javanica* por ocasião do posio. No tratamento com a mesma dosagem de endósporos em alface lisa, com o sistema radicular incorporado ao solo, ocorreu redução populacional do

nematóide. Por outro lado, nos tratamentos em que o sistema radicular da alface crespa foi incorporado ao solo, os dois tratamentos com ou sem pousio, não diferiram, estatisticamente entre si (Figura 4). De uma maneira geral, o pousio realizou-se em condições de umidade elevada, pois a precipitação neste período de novembro a dezembro/2000 foi intensa. Durante os 60 dias em que permaneceram na casa de vegetação, os vasos não secaram completamente, embora, o solo tenha sido mantido sem irrigação durante todo esse período. Essa deve ter sido uma das razões do controle deficiente de *M. javanica* dos tratamentos com pousio. De uma maneira geral, os nossos resultados diferiram dos obtidos por Campos (1987), que em condições de pousio observou uma redução acentuada da população de *M. javanica*, da ordem de 50% após 30 dias e que continuou a decrescer até 100 dias. Analisando o efeito da no pousio (Figura 5) pode-se observar que o pousio, com poucas exceções, causou redução dos valores dos parâmetros que medem o grau de supressividade exercido por *P. penetrans*, ou seja: percentagem de fêmeas infectadas, percentagem de J2 com endósporos aderidos e número médio de esporos aderidos em 100 J2. Isso demonstrou que o pousio teve um efeito negativo no grau de infecção exercido pela bactéria.

4) Comparação entre o primeiro e segundo ensaio

Quanto ao nível populacional de *M. javanica*, comparando-se o primeiro ao segundo ensaio observou-se que houve um aumento de cerca de 100 vezes na testemunha do primeiro para o segundo ensaio e de 10 a 30 vezes para os demais tratamentos (Tabela 2 e 3). Ocorreram reduções significativas das populações no segundo ensaio, sobretudo quando as raízes da alface tratadas com a dose 10^6 esporos/g de substrato foram incorporadas ao solo. Essa redução embora tenha sido significativa, ela não foi efetiva, considerando-se os índices de galhas e massas de ovos sobretudo do segundo ensaio (Tabela 4). Na verdade essa baixa eficiência de controle pode ser explicada em parte pelo tempo restrito de 200 a 260 dias (pousio) em que foi conduzido o ensaio. Mankau (1980) observou que após 4 a 5 gerações do cultivo do tomate em vasos, a população de *Meloidogyne* spp. aproximou-se da extinção, devido a infestação com *P. penetrans*. Mas a razão mais importante da baixa eficiência da bactéria foi a lixiviação dos esporos nas mudas. Dessa maneira, não seria recomendado o uso da bactéria, sobretudo veiculada em mudas para olericultores que desejam um controle imediato do nematóide.

Quanto ao nível de supressividade, fazendo-se uma análise global dos três parâmetros (Tabelas 2 e 4), ocorreu um aumento significativo do número de fêmeas infectadas, da porcentagem de J2 com esporos aderidos e do número médio de esporos aderidos em 100 J2, do primeiro para o segundo ensaio, sobretudo nos tratamentos que tiveram as raízes incorporadas ao solo, demonstrando que tanto para o tratamento 10^5 endósporos/g de substrato, como para o tratamento 10^6 ocorreu um aumento de infecção causada por *P. penetrans*, ao longo do tempo, desde que o sistema radicular da primeira cultura, no caso a alface, seja incorporado ao solo. A razão da pouca eficiência de *P. penetrans* no controle de *M. javanica* deve-se provavelmente à baixa concentração de endósporos no solo. Esses valores variaram de 0,9 a 45 % dos J2 infestados com e 0 a 4 endósporos/J2 no primeiro ensaio (Tabela 3) e de 3,5 a 63,2 % dos J2 infestados com 0,1 a 9 no segundo (Tabela 5), mostrando serem ainda esses níveis de parasitismo muito baixos, o que permitiu a penetração de um grande número de J2 nas raízes. Stirling (1984) demonstrou que um controle efetivo de *M. javanica* foi obtido no campo em tomateiros, quando 80% dos J2 foram parasitados com 10 ou mais endósporos/J2. Demonstrou também, que o número de raízes infectadas decrescia com o aumento da concentração de endósporos/J2, mostrando que 5 ou mais endósporos por J2 são necessários para garantir a infecção por *P. penetrans*.

Literatura Citada

AHMED, R. **Studies on the efficacy of *Pasteuria penetrans* for the biological control of *Meloidogyne* species.** 1990. Dissertation (Ph.D) - University of Reading, UK.

AHMED, R.; GOWEN, S. R. Studies on the infection of *Meloidogyne* spp. with isolates of *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 19, p. 229-233, 1991.

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

BROWN, S. M.; KEPNER, J. L.; SMART JUNIOR, G. C. Incresead crop yields following application of *Bacillus penetrans* in field plots infested with

Meloidogyne incognita. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, UK, v. 17, p. 483-486, 1985.

BROWN, S. M.; SMART JUNIOR, G. C. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 17, p. 123-126, 1985.

CAMPOS, V. P. Sobrevivência de *Meloidogyne javanica* no solo e em raízes de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, p. 191-196, 1987.

CAMPOS, V. P. Perspectiva do Controle biológico de nematóides. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, p. 26-30, 1992.

CARNEIRO, R. M. D. G. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 113-121, 1992. Ed. especial.

CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; FREITAS, L.; DICKSON, D. W. Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematology**, v. 3, p. 267-271, 1999.

CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; ALMEID, M. R. A. A. Resistance of vegetable crops to *Meloidogyne* spp.: Suggestion for a crop rotation system. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 49-54, 2000.

CHANNER, A. G. de R.; GOWEN, S.R. Preliminary studies on the potential of *Pasteuria penetrans* to control *Meloidogyne* species. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE – PESTS AND DISEASES, 1988. Brighton. **Proceedings**. Brighton: BCPC, 1988.

CHARCHAR, J. M.; MOITA, A.W. Reação de cultivares de alface à infecção por misturas populacionais de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em, condições de campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 14, p. 185-189, 1996.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D. W.; MCSORLEY, R.; MITCHELL, D. J.; HEWLETT, T. E. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of

Pasteuria penetrans. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 28, p. 159-168, 1996.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D. W. HEWLETT, T. E. Quantification of endospores concentration of *Pasteuria penetrans* in tomato root material. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 28, p. 50-55, 1996.

CIANCIO, A.; MANKAU, R.; MUNDO-OCAMPO, M. Parasitism of *Helicotylenchus lobus* by *Pasteuria penetrans* in naturally infested soil. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 24, p. 29-35, 1992.

DAUDI, A. T.; GOWEN, S. R. The potential for managing root-knot nematodes by use of *Pasteuria penetrans* and oxamil. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 20, p. 241-244, 1992.

DAVIES, K. G.; FLYNN, C. A.; KERRY, B. R. The life-cycle and pathology of the root-knot nematode parasite *Pasteuria penetrans*. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE – PESTS AND DISEASES, 1988. Brighton. **Proceedings**. Brighton: BCPC, 1988. v. III.

DICKSON, D. W.; OOSTENDORP, M.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; MITCHELL, D. J. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: D. ROSEN; BENNETT, F. D.; CAPINERA, J. L. (Ed.) **Pest management in the subtropics: biological control, a Florida perspective**. Andover: Intercept, 1994.

DUBE, B. N. Integrated application of *Paecilomyces lilacinus*, *Pasteuria penetrans* and cattle manure for control of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 19, p. 222-227, 1987.

DUBE, B.; SMART JUNIOR, G. C. Biological control of *Meloidogyne incognita* with *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 19, p. 222-227, 1987.

DUTKY, E. M.; SAYRE, R. M. Some factors affecting infection of nematodes by bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL,

v. 10, 285, 1978. Abst.

FREITAS, L. G. The effect of soil solarization, organic amendment, and fumigant nematicides on *Pasteuria penetrans* and its infectivity to *Meloidogyne arenaria* race 1 in tomato. 1997. Thesis (PhD) - University of Florida, Florida. 155 p.

FREITAS, L. G.; CARNEIRO, R. M. D. G. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* sp. In: MELO I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2 . 388 p.

FREITAS, L. G; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J.; McSORLEY, R. Supression of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans* in the field. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 24, 147-156, 2000.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: BARKER, K. R.; CARTER, C.C.; SASSER, J. N. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina State University: Departament of Plant Pathology, 1985. p. 69-77. v. II - Methodology.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, MD, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nemtodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, CA, v. 24, p. 453- 489, 1986.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, MD, v. 48, p. 692, 1964.

KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 22, p. 621-631, 1990.

MANKAU, R. Biological control of *Meloidogyne* populations by *Bacillus*

penetrans in West Africa. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 12, p. 230, 1980.

MANKAU, R.; PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 9, p. 40-45, 1977.

MINTON, N. A.; SAYRE, R. M. Suppressive influence of *Pasteuria penetrans* in Georgia soils on reproduction of *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 21, p. 574-575, 1989. Abstr.

MOUSA, E. M. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 23, p. 542, Oct. 1991. Abstr.

OOSTENDORP, M.; DICKSON; D. W.; MITCHELL, D. J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 22, p. 525-531, 1990.

OOSTENDORP, M.; DICKSON; D. W.; MITCHELL, D. J. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL, v. 23, p. 58-64, 1991.

POINAR JUNIOR., G. O.; JANSSON, H. (Ed.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRCPress. 1988a. v.1. 149 p.

POINAR JUNIOR., G. O.; JANSSON, H. (Ed.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRCPress. 1988b. v.2 . 139p.

SAYRE, R. M. Pathogens for biological control of nematodes. **Crop Protection**, Surrey, UK, v. 5, p. 268-276, 1986.

SAYRE, R. M.; STARR, M. P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. ver., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, DC, v. 52, p. 149-165, 1985.

SEKHAR, N. S.; GILL, J.S. Penetration and multiplication of *Meloidogyne*

incognita as influenced by *Pasteuria penetrans*. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 20, p. 213-218, 1990.

SHARMA, R. D. Biocontrol efficiency of *Pasteuria penetrans* against *Meloidogyne javanica*. **Ciencia Biológica, Ecologia e Sistemática**, v. 12, p. 43-47, 1992.

SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Controle biológico de *Meloidogyne arenaria* com *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 23, p. 47-52, 1999.

SOUZA, J. T. **Epidemiologia, infectividade e parasitismo de Pasteuria spp. em fitonematóides**. 1997. 123 f. Tese (Mestrado) - UFLA, Lavras.

STARR, M. P.; SAYRE, R. M. *Pasteuria thornei* sp. nov and *Pasteuria penetrans* sensu strict emend., mycelial and endospore forming bacteria parasitic, respectively, on plant parasitic nematodes of genera *Pratylenchus* and *Meloidogyne*. **Annales de L'Institut Pasteur. Serie Microbiologie**, Paris, v. 139 , p. 11-31, 1988.

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

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

STIRLING, G. R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, MN, v. 74, p. 55-60, 1984.

STIRLING, G. R. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. **Nematologica**, Leiden, v. 31, p. 203-209, 1985.

STIRLING, G. R.; WHITE, A. M. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australia vineyards. **Plant Disease**, St. Paul, MN, v. 66, p. 52-53, 1982.

STIRLING, G. R.; SHARMA, R. D.; PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects of the

infectivity. **Nematologica**, Leiden, v. 36, p. 246-252, 1990.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology**: identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh: North Carolina State University, 1978. 111 p.

THORNE, G. *Dubosqia penetrans* n. sp. (Sporozoa: Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, DC, v. 7, p. 51-53, 1940.

TZORTZAKAKIS, E. A.; GOWEN, S. R. Evaluation of *Pasteuria penetrans* alone and in combination with oxamyl, plant resistance and solarization for control of *Meloidogyne* spp. on vegetables grown in greenhouses in Crete. **Crop Protection**, Surrey, UK, v. 13, p. 455-462, 1994.