

JORGE TEODORO DE SOUZA

**EPIDEMIOLOGIA, INFECTIVIDADE E PARASITISMO
DE *PASTEURIA* SPP. EM FITONEMATÓIDES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de "MESTRE".

Orientador
Prof. VICENTE PAULO CAMPOS

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997

Ficha Catalográfica Preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Souza, Jorge Teodoro de.

Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em
fitonematóides / Jorge Teodoro de Souza. -- Lavras: UFLA, 1997.
123P. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Controle Biológico. 2. Fitonematóides. 3. Bactéria. 4. *Pasteuria* spp.
Epidemiologia. 6. Parasitismo. 7. Infectividade. 8. Tomate. 9. Isolado
PI-UFLA. 10. *Meloidogyne* spp. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título

CDD-632.96


JORGE TEODORO DE SOUZA

EPIDEMIOLOGIA, INFECTIVIDADE E PARASITISMO DE
PASTEURIA SPP. EM FITONEMATÓIDES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de "MESTRE".

APROVADA em 06 de agosto de 1997


Prof. Leandro Grassi de Freitas


Prof. Ricardo Magela de Souza


Prof. Vicente Paulo Campos
Orientador

A Deus, que nos colocou no
caminho da vida para
com ela aprendermos.

OFEREÇO.

Aos meus pais, Cleuza e Paulino,
pela compreensão, incentivo, confiança
e apoio. As minhas irmãs, Cleide, Marly
e Cenir, ao meu irmão Adenir e a minha
sobrinha Kim, pelo carinho e pela força,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força na realização deste trabalho;

Ao Orientador - prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pelos ensinamentos e pelo exemplo de competência;

Ao prof. Daniel Furtado Ferreira pela ajuda nas análises estatísticas e ao Mr. Cleber Maximiniano pelas sugestões;

Aos professores Ricardo Magela de Souza, Leandro Grassi de Freitas e ao Prof. José da Cruz Machado pela participação na banca e pelas valiosas sugestões;

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia pelo aprendizado e convivência;

Ao Fernando da Silva Rocha e ao Carlos Luzia pela ajuda na condução dos trabalhos;

À Alaíde A. Krzyzanowski, Maria de Fátima A. Silva, ao João Flávio Veloso Silva e Paulino José Melo Andrade pelo fornecimento de populações de nematóides;

Aos colegas da pós-graduação e da graduação pela amizade e estímulo;

À UFLA e ao CNPq, pela oportunidade e suporte financeiro;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho ...

Muito Obrigado !

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS (APÊNDICE).....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Histórico e Taxonomia.....	3
2.2 Ciclo de Vida.....	5
2.3 Diversidade Morfológica e Biológica.....	11
2.4 Ocorrência e Flutuação Populacional.....	14
2.5 Produção e Quantificação de Inóculo de <i>Pasteuria</i> spp.....	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
4 CAPÍTULO I FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DE FITONEMATÓIDES ASSOCIADOS COM <i>PASTEURIA</i> SPP. EM TRÊS ÁREAS NATURALMENTE INFESTADAS.....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	33
4.1 INTRODUÇÃO.....	35
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.3.1 Microparcelas de fibra de vidro cultivadas com tomateiro e infestadas por <i>Meloidogyne</i> spp., <i>Pratylenchus brachyurus</i> e <i>Aphelenchus</i> sp. associados com <i>Pasteuria</i> spp.....	42
4.3.2 <i>Heliconia</i> sp. infestada por <i>Meloidogyne</i> sp. associado a <i>Pasteuria</i> sp.....	49
4.3.3 Citros infestado por <i>Tylenchulus semipenetrans</i> associado a <i>Pasteuria</i> sp.....	51
4.4 CONCLUSÕES.....	55
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
5 CAPÍTULO II ADESÃO DE ENDÓSPOROS DO ISOLADO P1-UFLA DE <i>PASTEURIA</i> SP. EM FITONEMATÓIDES.....	60
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
5.1 INTRODUÇÃO.....	63

5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.3.1 Hospedeiros do isolado P1-UFLA de <i>Pasteuria</i> sp.....	69
5.3.2 Mobilidade de J ₂ de <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> infestados por <i>Pasteuria</i> sp.....	72
5.3.3 Efeito da idade dos J ₂ de <i>M. javanica</i> sobre a adesão de endósporos.....	72
5.3.4 Adesão de endósporos em J ₂ de <i>M. javanica</i> e <i>M. incognita</i> raça 1....	73
5.4 CONCLUSÕES.....	75
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
6 CAPÍTULO III QUANTIFICAÇÃO DE ENDÓSPOROS DE PASTEURIA SP. EM SOLO E RAÍZES.....	79
RESUMO.....	80
ABSTRACT.....	81
6.1 INTRODUÇÃO.....	82
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	84
6.2.1 Quantificação de endósporos em raízes.....	84
6.2.2 Quantificação de endósporos em solo.....	85
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
6.3.1 Quantificação de endósporos em raízes.....	88
6.3.2 Quantificação de endósporos em solo.....	89
6.3.2.1 Curvas padrão em solo e areia.....	89
6.3.2.2 Quantificação	93
6.4 CONCLUSÕES.....	95
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
7 CAPÍTULO IV EFEITO DO ISOLADO P1-UFLA DE PASTEURIA SP. SOBRE A PRIMEIRA GERAÇÃO DE MELOIDOGYNE JAVANICA (TREUB) CHITWOOD.....	99
RESUMO.....	100
ABSTRACT.....	101
7.1 INTRODUÇÃO.....	102
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	104
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
7.4 CONCLUSÕES.....	111
7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
APÊNDICE.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Diâmetro, altura e razão entre ambos, dos endósporos de <i>Pasteuria</i> spp. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	54
2	Percentagem de infestação e número de endósporos do isolado P1-UFLA de <i>Pasteuria</i> sp./espécimen de diversas espécies ou populações de nematóides obtidos de diferentes localidades após centrifugação e percentagem de fêmeas de <i>Meloidogyne</i> spp. parasitadas (% de parasitismo) após 35 dias da inoculação em tomateiro. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	70
3	Características químicas e físicas dos solos utilizados para a quantificação de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	87
4	Comparação de métodos para a quantificação de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp. em raízes de tomateiro. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	88
5	Número de endósporos/g de solo em função do número de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp./J ₂ e percentagem de J ₂ com endósporos aderidos na cutícula (dados originais, dados transformados e dados preditos pela regressão). UFLA, Lavras - MG, 1997.....	93
6	Número médio de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp./J ₂ , percentagem média de J ₂ infestados (dados originais e dados transformados) e número estimado de endósporos/g de solo utilizando-se os dados originais e os transformados, em diferentes amostras de solo. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	94
7	Efeito de diferentes níveis de inóculo sobre a primeira geração de <i>Meloidogyne javanica</i> , dados originais. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Pasteuria</i> sp. e de <i>Meloidogyne</i> sp. (Adaptado de Sayre, 1980). UFLA, Lavras - MG, 1997.....	6
2	Esquema da ultraestrutura de endósporos maduros de <i>Pasteuria</i> sp. (Adaptado de Giblin-Davis, McDaniel e Bilz, 1990). UFLA, Lavras - MG, 1997.....	7
3	Associação de J ₂ <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Pasteuria</i> sp. em microparcelas cultivadas com tomateiro. (A) Densidade populacional de <i>Meloidogyne</i> spp./100 cm ³ de solo, (B) Curva ajustada aos dados, (C) Percentagem média de endósporos/J ₂ , (D) Curva ajustada aos dados, (E) Número médio de endósporos/J ₂ , (F) Curva ajustada aos dados. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	43
4	Associação de <i>Pasteuria</i> spp. e <i>Pratylenchus brachyurus</i> . (A) Número médio de <i>P. brachyurus</i> /100 cm ³ de solo, (B) Percentagem média de infestação e/ou parasitismo, (C) Número médio de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp./espécimen. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	47
5	Associação de <i>Pasteuria</i> spp. com <i>Aphelenchus</i> sp. (A) Número médio de <i>Aphelenchus</i> sp./100 cm ³ de solo, (B) Percentagem de infestação, (C) Número médio de endósporos de <i>Pasteuria</i> spp./espécimen. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	48
6	Associação de J ₂ de <i>Meloidogyne</i> sp. e <i>Pasteuria</i> sp. (A) Densidade populacional de <i>Meloidogyne</i> sp./100 cm ³ de solo, (B) Percentagem média de infestação, (C) Número médio de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp./J ₂ . UFLA, Lavras - MG, 1997.....	50

Figura		Página
7	Associação de <i>Pasteuria</i> sp. e <i>T. semipenetrans</i> . (A) Densidade de J ₂ de <i>T. semipenetrans</i> /100 cm ³ de solo, (B) Percentagem média de infestação e/ou parasitismo em J ₂ , (C) Número médio de endósporos/J ₂ , (D) Número médio de machos adultos de <i>T. semipenetrans</i> /100 cm ³ de solo, (E) Percentagem média de infestação e/ou parasitismo em machos, (F) Número médio de endósporos/macho. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	51
8	Mobilidade de J ₂ de <i>Meloidogyne javanica</i> (A) e <i>Meloidogyne incognita</i> raça 1 (B), medida pelo número médio desses nematóides que atravessaram o papel toalha após a não centrifugação (S/C) e centrifugados, para a obtenção de 0 endósporos/J ₂ (0), 1-10 endósporos/J ₂ (1-10) e 11-30 endósporos/J ₂ (11-30). UFLA, Lavras - MG, 1997.....	73
9	Número médio de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp./J ₂ de <i>Meloidogyne javanica</i> P4 com diferentes idades. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	74
10	Número médio de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp./J ₂ de <i>M. javanica</i> P4 e <i>M. incognita</i> raça 1 vivos ou mortos por tratamento térmico. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	73
11	Curva padrão em solo. (A) Número médio de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp./J ₂ de <i>M. incognita</i> raça 1 em solo com diferentes concentrações de endósporos, (B) Curva ajustada aos dados, (C) Percentagem média de J ₂ com endósporos aderidos à cutícula, (D) Curva ajustada aos dados. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	90
12	Curva padrão em areia. (A) Número médio de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp./J ₂ de <i>M. incognita</i> Raça 1, em areia com diferentes concentrações de endósporos, (B) Curva ajustada aos dados, (C) Percentagem média de J ₂ com endósporos aderidos à cutícula, (D) Curva ajustada aos dados. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	91

- 13 Número total de fêmeas de *M. javanica* nas raízes de tomateiros após a inoculação de J₂ com diferentes níveis de inóculo do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. aderidos na cutícula. (Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$). UFLA, Lavras - MG, 1997..... 107
- 14 Percentagem de fêmeas de *M. javanica* parasitadas após a inoculação de J₂ com diferentes níveis de inóculo do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. aderidos na cutícula. (Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$). UFLA, Lavras - MG, 1997..... 108
- 15 Número de ovos produzidos por fêmeas de *M. javanica* no sistema radicular de tomateiros após a inoculação de J₂ com diferentes níveis de inóculo de *Pasteuria* sp. aderidos na cutícula. (Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$). UFLA, Lavras - MG, 1997..... 109

LISTA DE TABELAS
(APÊNDICE)

Tabela	Página
1A Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo das flutuações populacionais de <i>Meloidogyne</i> spp. associado com <i>Pasteuria</i> sp. em microparcelas instaladas em área anexa ao Departamento de Fitopatologia. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	119
2A Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo das flutuações populacionais de <i>Tylenchulus semipenetrans</i> associado com <i>Pasteuria</i> sp. em pomar de citros localizado no município de Luminárias - MG. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	119
3A Coeficientes de correlação parcial e a significância dos mesmos, em dados obtidos do estudo das flutuações populacionais de <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Tylenchulus semipenetrans</i> naturalmente associados com <i>Pasteuria</i> spp. respectivamente em microparcelas e em um pomar de citros. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	120
4A Coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre dados climáticos e fitonematóides associados com <i>Pasteuria</i> spp. em microparcelas e em um canteiro plantado com <i>Heliconia</i> sp. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	120
5A Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo sobre a gama de hospedeiros do isolado P1-UFLA de <i>Pasteuria</i> sp. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	121
6A Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo sobre o efeito do isolado P1-UFLA de <i>Pasteuria</i> sp. sobre a mobilidade de J ₂ de <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>M. incognita</i> . UFLA, Lavras - MG, 1997.....	121

Tabela		Página
7A	Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo sobre o efeito da idade dos J ₂ de <i>Meloidogyne javanica</i> na adesão de endósporos do isolado P1-UFLA de <i>Pasteuria</i> sp. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	121
8A	Resumo da análise de variância dos dados obtidos na comparação de métodos para a quantificação de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp. em raízes de tomateiro. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	122
9A	Resumo da análise de variância dos dados obtidos na confecção de curvas-padrão da concentração de endósporos de <i>Pasteuria</i> sp. em solo e areia. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	122
10A	Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo do efeito do isolado P1-UFLA de <i>Pasteuria</i> sp. sobre a primeira geração de <i>Meloidogyne javanica</i> . UFLA, Lavras - MG, 1997.....	123
11A	Coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre os dados referentes ao estudo do efeito do isolado P1-UFLA de <i>Pasteuria</i> sp. sobre a primeira geração de <i>Meloidogyne javanica</i> . UFLA, Lavras - MG, 1997.....	123

RESUMO

SOUZA, Jorge Teodoro de. **Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides**. Lavras: UFLA, 1997. 123p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia). *

Estudaram-se, em amostragens mensais, durante o período de um ano, as flutuações populacionais de *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Pratylenchus brachyurus*, *Aphelenchus* sp., *Meloidogyne* sp. e *Tylenchulus semipenetrans* associados com *Pasteuria* spp. em três áreas naturalmente infestadas. Os resultados obtidos indicaram que *Pasteuria* spp. e os nematóides hospedeiros não estavam em equilíbrio nas áreas estudadas. Observou-se uma grande diversidade morfológica nos endósporos de *Pasteuria* spp. associados a diferentes nematóides hospedeiros. O estudo da gama de hospedeiros do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. foi realizado através do método da centrifugação e posterior inoculação dos nematóides em tomateiro para a avaliação do parasitismo. Das 12 espécies de nematóides testadas, apenas *M. javanica* e *M. incognita* puderam ser considerados hospedeiros deste isolado da bactéria. A mobilidade dos juvenis do segundo estágio (J₂) de *M. incognita* e *M. javanica*, avaliada através do método de Moje, não foi afetada pela centrifugação ou pela presença de endósporos aderidos à cutícula. A morte dos J₂ de *M. javanica* e *M. incognita* pelo calor diminuiu drasticamente o número de endósporos de *Pasteuria* sp. aderidos à cutícula. Através do uso do método da digestão enzimática, obteve-se uma maior quantidade de endósporos/g de raiz de tomateiro. Para a quantificação de endósporos em solos infestados, confeccionaram-se curvas-padrão em solo argiloso e areia. Os

* Orientador: Vicente Paulo Campos. Membros da Banca: Ricardo Magela de Souza e Leandro Grassi de Freitas.

endósporos mostraram-se mais disponíveis para a adesão em J₂ de *Meloidogyne* em areia que em solo argiloso. Em diversas amostras de solo, a concentração de endósporos, estimada através da interpretação de resultados de biotestes na curva-padrão, revelou-se insuficiente para a supressão de populações de *Meloidogyne*. A eficiência do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. no controle de *M. javanica* foi avaliada em condições de laboratório. O maior nível de inóculo em J₂ (23 endósporos/J₂) causou uma redução de 69 % nas fêmeas nas raízes e 99,09 % na produção de ovos/sistema radicular, ocorrendo uma percentagem média de parasitismo da ordem de 93,15.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os fitonematóides têm causado sérios danos à agricultura, principalmente nos países de clima tropical e subtropical. Segundo Sasser e Freckman (1989), citados por Tihohod (1993) se consideradas todas as culturas, as perdas mundiais provocadas por estes fitoparasitas, chegam a U\$ 100 bilhões anualmente. No Brasil, as perdas quantitativas causadas por fitonematóides situam-se em torno de 14% da produção (Lordello, 1984).

O controle de fitonematóides tem sido feito tradicionalmente através de nematicidas químicos ou do plantio de variedades resistentes ou tolerantes. Esses métodos, na maioria das vezes não estão prontamente disponíveis para o agricultor ou são inviáveis. O controle químico, além dos altos custos, pode deixar resíduos tóxicos no meio ambiente e a obtenção de variedades resistentes ou tolerantes requer um período de tempo considerável (Novaretti, 1991). Dessa forma, métodos alternativos, dentre eles o controle biológico, passaram a receber maior atenção dos pesquisadores.

Os fitonematóides possuem muitos inimigos naturais, como vírus, riquetsias, fungos, nematóides nematófagos, tardígrados, ácaros, turbelárias, insetos e bactérias, exercendo tais organismos, na natureza, algum controle sobre a população desses patógenos (Campos, 1989). Entretanto, dentre esses inimigos naturais, apenas algumas espécies de fungos e de bactérias apresentam potencial para serem usados racionalmente como agentes de controle biológico.

As bactérias do “grupo *Pasteuria penetrans*” (Thorne, 1940) Sayre e Starr (1985) têm sido apontadas como os agentes de maior potencial para o controle biológico de

vários gêneros de fitonematóides em condições de campo (Mankau, 1980; Stirling, 1981; Ciancio, Mankau e Mundo-Ocampo, 1992). Este potencial é atribuído a sua habilidade em controlar fitonematóides em diversas culturas (Jatala, 1986), resistência dos endósporos à dessecação e temperaturas extremas (Dutky e Sayre, 1978; Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1990), compatibilidade com vários pesticidas (Dube e Smart Jr., 1987; Daudi e Gowen, 1992; Tzortzakakis e Gowen, 1994) e com outros organismos, como os fungos nematófagos (Mousa, 1991; Dube, 1994).

No Brasil, os estudos sobre as bactérias do "grupo *Pasteuria penetrans*" são ainda muito insipientes. Com a realização deste trabalho objetivou-se estudar aspectos ligados à flutuação populacional de fitonematóides naturalmente associados com *Pasteuria* spp., à adesão de endósporos do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. em diversos fitonematóides, à quantificação de endósporos em raízes e no solo e o efeito do isolado P1-UFLA sobre *M. javanica*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico e Taxonomia

O primeiro relato acerca das bactérias atualmente conhecidas como *Pasteuria* spp. foi feito por Cobb (1906) citado por Sayre e Starr (1985). Cobb encontrou endósporos deste organismo infectando o nematóide *Dorylaimus bulbiferous* Cobb e imaginou tratar-se de um protozoário. Micoletzky (1925) citado por Mankau (1975b) descreveu duas espécies de protozoários parasitos de nematóides pertencentes ao gênero *Duboscqia* Perez. Em 1940, Thorne, provavelmente influenciado por Micoletzky (Mankau, 1975b), descreveu com detalhes um parasito de *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev e Stekhoven, como *Duboscqia penetrans* Thorne. Outros investigadores (Williams, 1960; Canning, 1973), auxiliados por microscópios mais modernos, examinaram detalhadamente o parasito e questionaram sua posição taxonômica, entretanto, apenas com o uso da microscopia eletrônica foi possível o estabelecimento de sua natureza procariótica e afinidade bacteriana (Mankau, 1975a; 1975b; 1976; Mankau e Imbriani, 1975; Mankau, Imbriani e Bell, 1976), sendo o nome *Bacillus penetrans* (Thorne, 1940) Mankau (1975) adotado para o parasito de *Meloidogyne* (Goeldi). Contudo, *B. penetrans* não foi incluído na lista de nomes de bactérias aprovadas, publicada em 1980, pois apresentava características distintas do gênero *Bacillus* Cohn, como a forma e tamanho das células, mobilidade, formato e tamanho dos esporângios, habitat e requerimentos nutricionais (Sayre e Starr, 1985). Desta forma, após muitos estudos, Sayre e Starr

sugeriram sua inclusão no gênero *Pasteuria* Metchnikoff, 1988, com o nome *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n.

O gênero *Pasteuria* consiste atualmente de quatro espécies de bactérias (actinomicetes) parasitas obrigatórias, Gram-positivas, formadoras de endósporos e micélio septado: (1) *P. ramosa* Metchnikoff, 1888 (espécie tipo), parasita da hemolinfa de pulgas aquáticas das espécies *Daphnia pulex* Leydig, *D. magna* Strauss e *Moina rectirostris* Leydig (Metchnikoff, 1888; Sayre, Wergin e Davis, 1977); (2) *P. penetrans* (Thorne, 1940) Sayre e Starr, 1985, parasita do nematóides das galhas, *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood e outras espécies do gênero (Sayre e Starr, 1985); (3) *P. thornei* Starr e Sayre, 1988, parasita do nematóide das lesões, *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies do gênero (Starr e Sayre, 1988) e (4) *P. nishizawae* Sayre et al, 1991, parasita de nematóides formadores de cisto, *Heterodera elachista* Oshima, *H. glycines* Ichinoe, *H. trifolii* Goffard e de *Globodera rostochiensis* Wollenweber (Sayre et al., 1991). A descrição dessas espécies baseou-se em características morfométricas e gama de hospedeiros.

Apesar da descrição de algumas espécies, a taxonomia de *Pasteuria* ainda necessita de muitos estudos para ser completamente entendida. Atualmente sabe-se que a bactéria não é uma entidade uniforme, constituindo-se de diferentes tipos patológicos, morfométricos, biológicos e provavelmente compreende múltiplos taxons com limitada gama de hospedeiros (Starr e Sayre, 1988). Atualmente, nenhum dado genético está disponível para estabelecer se as espécies descritas diferem em sua biologia e fisiologia, como diferem em morfometria e gama de hospedeiros, ou se algumas ou todas as espécies de *Pasteuria* serão consideradas como patótipos de uma única espécie (Ciancio et al., 1994).

Enquanto a taxonomia da bactéria permanecer indefinida, Sayre e Starr (1988) e Sayre et al. (1991) recomendam que o nome *Pasteuria penetrans* (e sinônimas anteriores: "*Duboscqia penetrans*, *Bacillus penetrans*") encontradas na literatura sejam chamados de *Pasteuria* spp. ou "membros do grupo *Pasteuria penetrans*".

2.2 Ciclo de Vida

Apesar das bactérias do “grupo *Pasteuria penetrans*” possuírem uma grande diversidade biológica, seu ciclo de vida em todos os nematóides hospedeiros parece ser similar. Neste trabalho, será tratado com mais detalhes sobre o ciclo de vida da bactéria em nematóides das galhas, principalmente pela importância agrícola do hospedeiro e pelo maior número de relatos encontrados em literatura.

O ciclo de *Pasteuria* sp. em *Meloidogyne* spp. (Figura 1) foi descrito por Mankau e Imbriani (1975) e suas observações confirmadas por Sayre e Wergin (1977) e por Imbriani e Mankau (1977). O ciclo da bactéria pode ser dividido em 5 fases:

1) Adesão de Endósporos na Cutícula

O endósporo maduro (Figura 2), encontrado no solo e em detritos de raiz, constitui a fase de resistência e a fase infectiva de *Pasteuria* sp. Os outros estádios do ciclo de vida do parasito são encontrados apenas no interior do nematóide hospedeiro. A adesão de endósporos na cutícula é a primeira fase do parasitismo, entretanto, esta adesão pode não estar correlacionada com a reprodução da bactéria no interior do nematóide (Stirling, 1985; Davies, Kerry e Flynn, 1988).

Os nematóides hospedeiros, em suas fases suscetíveis, tornam-se infestados quando se movimentam em solo contendo endósporos maduros da bactéria, que são altamente adesivos e fixam-se firmemente à cutícula do hospedeiro pelo seu lado côncavo (Mankau, 1975a). Cada nematóide hospedeiro pode conter de um a centenas de endósporos aderidos à cutícula. A adesão de endósporos na cutícula afeta a mobilidade dos J₂ de *Meloidogyne*, podendo impedir a penetração nas raízes. Juvenis com 7 a 50 endósporos aderidos na cutícula tem sua mobilidade reduzida (Stirling, 1984; Brown e Smart Jr., 1985; Davies et al., 1990). Os juvenis do segundo estágio (J₂) de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb e de *Meloidogyne* spp. com endósporos aderidos na cutícula tendem a se agrupar de forma característica, fato não ocorrido com juvenis e adultos de

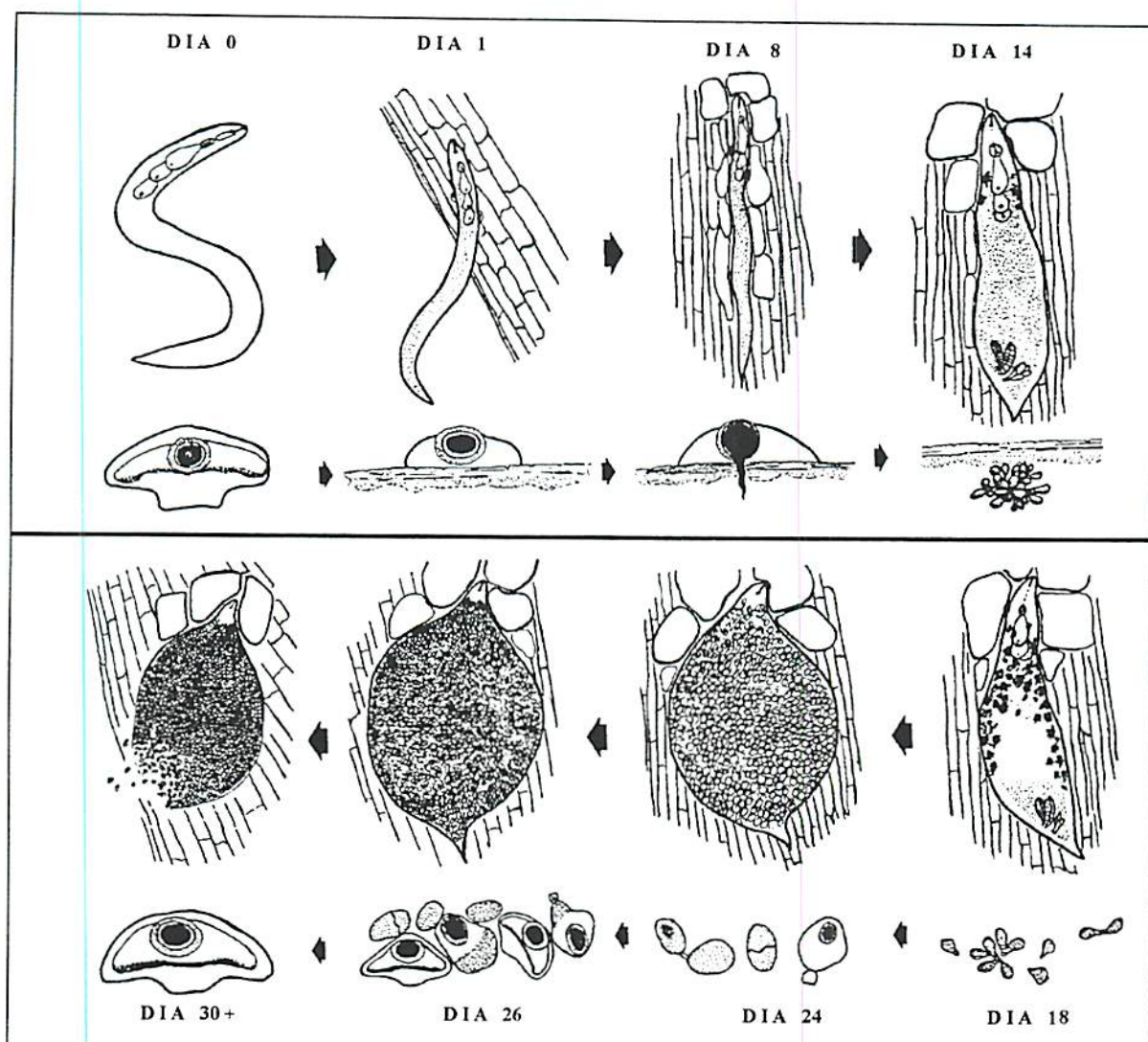


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Pasteuria* sp. e de *Meloidogyne* sp. (Adaptado de Sayre, 1980). UFLA, Lavras - MG, 1997.

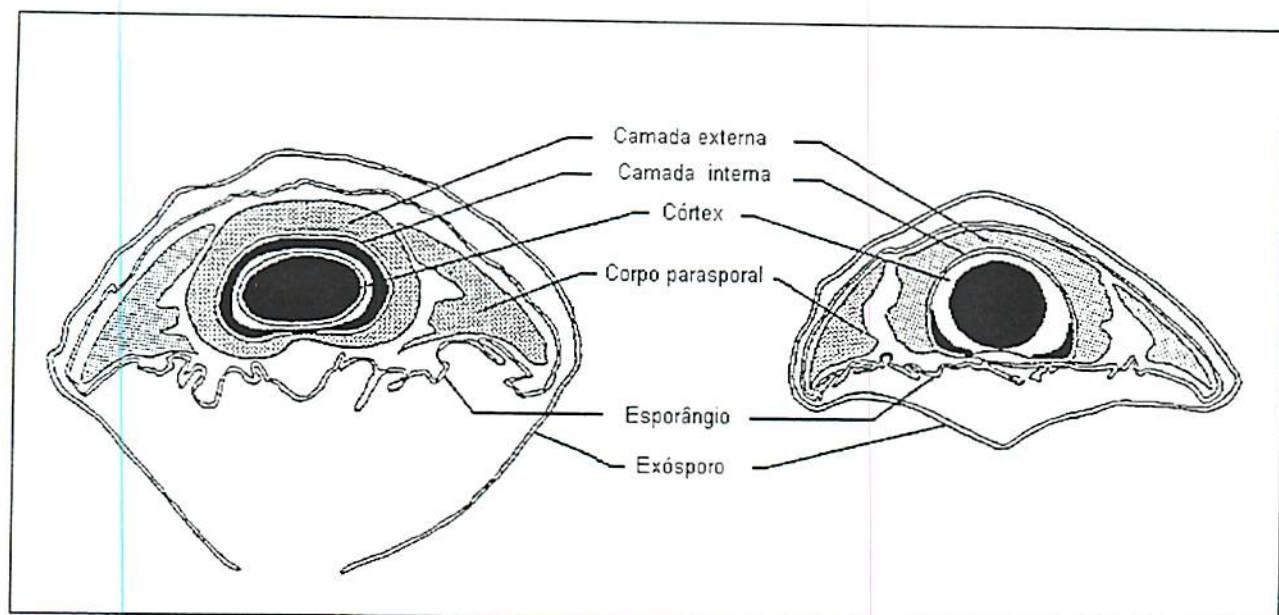


FIGURA 2. Esquema da ultraestrutura de endósporos maduros de *Pasteuria* sp. (Adaptado de Giblin-Davis, McDaniel e Bilz, 1990). UFLA, Lavras - MG, 1997.

Pratylenchus scribneri (Mankau e Prasad, 1977; Fattah, Saleh e Aboud, 1989).

Os diferentes isolados de *Pasteuria* spp., quando considerados individualmente, apresentam uma restrita gama de hospedeiros. Endósporos de diferentes isolados de *Pasteuria* sp. mostraram diferenças no nível de adesão em juvenis do segundo estágio de uma mesma espécie de *Meloidogyne* e entre populações e espécies de *Meloidogyne* (Stirling, 1985; Davies, Kerry e Flynn, 1988); além disso, endósporos obtidos da mesma espécie hospedeira com origem geográfica diversa, diferiram em suas características químicas e físicas (Bird et al., 1990). As interações entre a cutícula do nematóide hospedeiro e os endósporos de *Pasteuria* spp. ainda não foram elucidadas (Davies, Robinson e Laird, 1992), mas através da utilização de anticorpos policlonais e monoclonais, demonstraram-se a existência de diferenças qualitativas e quantitativas na superfície dos endósporos de diferentes isolados de *Pasteuria* spp. (Davies, Robinson e Laird, 1992; Davies, Redden e Pearson, 1994) e na cutícula de nematóides formadores

de galhas (Davies e Danks, 1992), o que pode contribuir para a explicação da especificidade apresentada pela bactéria.

Endósporos aderiram-se em J₂ pré-parasitas e em J₂ parasitas, mas não aderiram-se em machos e fêmeas, o que sugere uma mudança nos sítios de reconhecimento entre os endósporos e a cutícula com as ecdises (Stirling, Bird e Cakurs, 1986). Esses autores também demonstraram que a adesão de endósporos em J₂ vivos é maior do que nos mortos.

Vários são os fatores interferentes no processo de adesão. Stirling, Bird e Cakurs (1986) reportaram que o processo de sonificação aumentou significativamente a adesão, devido ao rompimento da parede do esporângio, expondo as fibras parasporais e permitindo um melhor contato com a cutícula do nematóide. Quando os esporos estão no solo, a degradação da parede do esporângio é provavelmente mediada por microorganismos, não sendo conhecida a relação destes com os endósporos. Ratnasoma e Gowen (1996) observaram que ocorreu menor adesão em pH 3 que em pHs maiores (4-10), sendo que o máximo de adesão ocorreu em pH 5. Em outro estudo, O'Brien (1980) não encontrou diferenças na taxa de adesão em pHs entre 4,5 e 8,5. A temperatura influencia o número de endósporos aderidos por J₂ (Stirling, 1981). Endósporos de *Pasteuria* sp. aderiram-se mais facilmente aos J₂ de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood à temperatura de 22,5 a 30 °C que a 15 °C. Em J₂ de *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, ocorreu uma maior taxa de adesão a 30 °C (Hatz e Dickson, 1992).

2) Germinação e Penetração

A germinação do endósporo só ocorre aproximadamente oito dias após a penetração do J₂ de *Meloidogyne* na raiz, quando o mesmo está se alimentando na planta hospedeira. A infecção não ocorre se o nematóide sofre uma ecdise antes da penetração na planta hospedeira (Mankau e Imbriani, 1975). O tubo germinativo emerge da parte central do endósporo e atravessa a cutícula, a hipoderme e os tecidos somáticos,

alcançando o pseudoceloma do nematóide, onde inicia o crescimento vegetativo (Sayre, 1980).

Para que ocorra o parasitismo, no mínimo um endósporo deve germinar, sendo necessários no mínimo cinco endósporos aderidos na cutícula de cada J₂, no caso de *M. javanica*, uma vez que apenas 20-30% deles germinam (Sayre e Wergin, 1977; Stirling, 1984). Recentemente, Sturham et al. (1994) observaram que a maior parte dos endósporos que se aderem à cutícula dos J₂ de *H. goettingiana* são vazios, ou seja, não possuem protoplasto na parte central. Talvez este fato possa explicar porque grande parte dos endósporos aderidos à cutícula não germinam. Existem também evidências de que os tubos germinativos podem algumas vezes não atravessar a cutícula (Birchfield e Antonopoulos, 1976).

3) Estádio Vegetativo

No pseudoceloma, são formadas micro-colônias esféricas, com aparência de crescimento fúngico, que, em exame mais acurado, revelam características bacterianas. Essas micro-colônias são constituídas de micélio septado com células de parede dupla. As micro-colônias sofrem fragmentação, formando as colônias filhas. Este processo ocorre periodicamente durante o estágio vegetativo do parasito. Gradualmente são formadas colônias filhas, contendo poucas, porém grandes células vegetativas. Este processo foi descrito com detalhes por Mankau (1975a), Mankau e Imbriani (1975), Sayre (1980) e Sayre e Wergin (1977).

A bactéria não impede a formação das células gigantes (Bird, 1986), porém, multiplica-se no pseudoceloma durante o desenvolvimento da fêmea, impedindo ou reduzindo sua capacidade reprodutiva.

4) Esporulação

Os estádios vegetativos são convertidos em estádios reprodutivos assexuais. As células terminais das micro-colônias, contendo duas ou quatro células formam esporângios, os quais produzem um único endósporo. Cada fêmea de *Meloidogyne* sp., ao final do ciclo, pode conter mais de 2 milhões de endósporos no interior do corpo. As fases da esporogênese foram ilustradas por Mankau (1975a); Mankau e Imbriani (1975); Imbriani e Mankau (1977); Sayre e Starr (1985) e por Starr e Sayre (1988).

O ciclo de endósporo a endósporo é altamente dependente da temperatura do solo (Stirling, 1981). A temperatura determina não apenas a duração do ciclo de vida mas também o número de endósporos produzidos por fêmea parasitada. Geralmente, todos os estádios do ciclo de vida são favorecidos por temperaturas em torno de 25 °C. *Pasteuria* spp. desenvolve-se mais rapidamente com o aumento da temperatura, completando o ciclo de vida em 85-100 dias a 20 °C, 37 a 47 dias a 25 °C e 20-30 dias a 30 °C. À temperatura de 30 °C, o parasita prolifera extensivamente nas fêmeas antes da maturidade, a 20 °C algumas fêmeas desenvolvem ovários com poucos ovos, antes que a infecção possa suprimir todo o desenvolvimento (Stirling, 1981). Segundo Hatz e Dickson (1992) a bactéria se desenvolve mais rapidamente dentro do hospedeiro a 30 e 35 °C que a 25 °C ou menos e houve uma maior produção de endósporos a 30 °C.

O regime de umidade afeta o número de fêmeas do nematóide das galhas nas raízes e a taxa de desenvolvimento de *Pasteuria* sp. no interior de fêmeas de *Meloidogyne incognita* (Davies, Laird e Kerry, 1991). Altos regimes de umidade reduzem o número de fêmeas e a taxa de desenvolvimento de *Pasteuria* sp. Em condições que favoreceram o desenvolvimento das fêmeas (baixa umidade), há uma maior percentagem de fêmeas parasitadas por *Pasteuria* sp. e uma maior taxa de desenvolvimento da bactéria no interior do hospedeiro. Segundo esses autores, a alta umidade pode diminuir a taxa de oxigênio, reduzindo o desenvolvimento do parasita e do hospedeiro.

5) Fase no Solo

Após a decomposição da cutícula da fêmea parasitada, os endósporos são liberados no solo e reiniciam o ciclo através da infestação de outros J₂. Os endósporos são altamente resistentes a dessecação e podem sobreviver por longos períodos no solo (Prasad e Mankau, 1969). Quando fêmeas parasitadas são esmagadas em laboratório, a maioria dos endósporos são cobertos pelo esporângio e pelo exósporo (Figura 2). Essas membranas são aparentemente removidas ou degradadas no solo por um processo não conhecido, expondo as fibras adesivas (Sayre, 1980). Em laboratório, o processo de sonificação, que rompe essas camadas, permite um acréscimo significativo na adesão.

A superfície dos endósporos possui uma rede de cargas negativas (Afolabi, Davies e O'Shea, 1995), tornando-os dependentes do pH, do eletrólito e da valência dos cátions. A cutícula dos nematóides possui também uma rede de cargas negativas (Himmelhoch et al., 1977, citados por Afolabi, Davies e O'Shea, 1995), sugerindo que as forças eletrostáticas entre a cutícula e os endósporos podem se opor à adesão, sendo que outras forças de atração têm grande importância no processo de adesão. A distribuição dos endósporos no solo pode ser afetada pela umidade, temperatura, textura, estrutura e matéria orgânica dos solos (Stirling, 1991).

2.3 Diversidade Morfológica e Biológica

Os fatores responsáveis pela diversidade morfológica e biológica observada na associação *Pasteuria*-nematóide hospedeiro não são conhecidos, entretanto, a bactéria, devido ao caráter obrigatório de seu parasitismo, evoluiu juntamente com os nematóides, e este fato parece ter contribuído para a seleção de formas especializadas do parasito durante a co-evolução desses organismos (Ciancio et al., 1994).

O tamanho e o formato dos endósporos de *Pasteuria* variam de hospedeiro para hospedeiro. O diâmetro médio dos endósporos variou de 2,7 µm em um patótipo

encontrado em *Acrobeloides* sp. até 8,0 μm em um patótipo encontrado em *Axonchium valvulatum* e o diâmetro médio da parte central ou profundidade do endósporo de 0,9 em *Acrobeloides* sp. a 3,54 μm em um patótipo encontrado em *Hoplolaimus galeatus*. Os endósporos dos patótipos parasitas de *T. semipenetrans*, *Coslenchus turkeyensis*, *Pratylenchus neglectus* e *H. avenae* apresentaram uma forma rombóide, enquanto o patótipo parasita de *Coslenchus costatus* apresentou endósporos planos. Em espécies do gênero *Xiphinema*, os endósporos são convexos, em *Discocriconemella mauritiense*, *Scutellonema clathrycaudatum*, *Rotylenchus laurentinus*, *Longidorus attenuatus*, *Discolaimus major* e *Meloidogyne* spp., os endósporos apresentaram o formato de xícara, e em *H. goettingiana*, os endósporos apresentaram uma forma biconvexa ou lenticular a esferóide (Sayre et al., 1988; Davies et al., 1990; Giblin-Davis, McDaniel e Bilz, 1990; Ciancio et al., 1994; Sturham et al., 1994). O tamanho dos endósporos e do corpo do nematóide hospedeiro não estão correlacionados entre si (Sayre et al., 1988).

Registrou-se a ocorrência de isolados ou populações de *Pasteuria* spp. que requerem diferentes fases do ciclo de vida do nematóide hospedeiro para o desenvolvimento (Sayre et al., 1988; Fattah; Saleh e Aboud, 1989; Davies et al., 1990; Giblin-Davis, McDaniel e Bilz, 1990; Sturham et al., 1994).

Em nematóides das galhas, o patótipo originalmente descrito, infesta apenas J_2 e produz endósporos exclusivamente em fêmeas adultas (Mankau, 1975a; Sayre, 1980; Sayre et al., 1988). Entretanto, outros patótipos foram observados esporulando em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* sp. (Giblin-Davis, McDaniel e Bilz, 1990), *Meloidogyne incognita* (Hatz e Dickson 1992) e *Meloidogyne coffeicola* (Sturham, 1988). Machos de *M. arenaria* (Neal) Chitwood originados de reversão sexual por tratamento a 35 °C, com endósporos no interior do corpo foram observados por Hatz e Dickson (1992). Em uma população de *M. acronea* Coetzee, originária de Malawi, Page e Bridge (1985) observaram endósporos aderidos na cutícula de J_2 , machos e fêmeas adultas com ovos, sendo neste caso observada a germinação de endósporos através da cutícula dessas fêmeas e o desenvolvimento de novas infecções. Segundo os autores, todos os

estádios de desenvolvimento dessa espécie podem ser infectados, devido ao hábito semiendoparasita do nematóide.

Os estádios juvenis e adultos de *P. brachyurus* (Starr e Sayre, 1988); *Helicotylenchus lobus* (Ciancio, Mankau e Mundo-Ocampo, 1992); *Hoplolaimus galeatus* (Cobb) Thorne, *Belonolaimus longicaudatus* Rau, *Tylenchorhynchus annulatus* (Cassidy) Golden, *Helicotylenchus microlobus* Perry GIBLIN-DAVIS, McDaniel e Bilz (1990) e *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne (Ciancio, 1995) podem ser infestados e/ou parasitados pela bactéria. Um isolado de *Pasteuria* foi observado esporulando em J₂ e machos de *Tylenchulus semipenetrans* (Fattah, Saleh e Aboud, 1989; Walter e Kaplan, 1990; Ciancio e Rocuzzo (1992). Inserra, Oostendorp e Dickson (1992) encontraram um isolado de *Pasteuria* cujos endósporos se aderem em J₂ e machos de *Trophonema okamotoi* Minagawa, entretanto, novos endósporos são produzidos apenas em J₃, J₄ e fêmeas. Na Europa, foram observados todos os estádios de desenvolvimento de *Pasteuria* spp. em J₂ de *Heterodera avenae* Wollenweber e em *H. goettingiana* Liebscher (Davies et al., 1990 e Sturham et al., 1994). Entretanto, em machos, apesar de terem sido observados endósporos aderidos na cutícula, jamais se confirmou o parasitismo. Outros isolados, originados da Ásia, com ciclo de vida similar àquele descrito para *Meloidogyne* spp., produziram endósporos em fêmeas jovens de *H. cajani* Koshy, *H. graminis* Stynes, *H. zae* Koshy; *H. elachista*; *H. glycines* e *Globodera rostochiensis* (Walia, Bansal e Bhatti, 1990 e Sayre et al., 1991). Por outro lado, um isolado de Illinois, EUA, observado na cutícula de J₂ e machos de *H. glycines*, não foi capaz de parasitar cistos e fêmeas jovens (Noel e Stanger, 1994).

Tendo em vista essa diversidade, é considerado prematura a atribuição de significância taxonômica a gama de hospedeiros e a diversidade morfométrica (Ciancio et al., 1994).

2.4 Ocorrência e Flutuação Populacional

Membros do grupo *Pasteuria penetrans* foram registrados em diferentes países e nematóides hospedeiros. Os primeiros relatos de ocorrência da bactéria foram feitos por pesquisadores que trabalhavam na identificação de nematóides (Cobb, 1906 citado por Sayre e Starr 1985; Thorne, 1940; Allen, 1941; 1957; Lordello, 1951; 1966a; 1966b; Siddiqi, 1963; 1969). No Brasil, o parasito foi citado pela primeira vez por Lordello (1951), que o encontrou parasitando *Xiphinema campinense* (= *X. elongatum* Sch. Stek. e Teun.). Posteriormente, diversos relatos provenientes principalmente de levantamentos nematológicos em todo o mundo confirmaram a grande distribuição de *Pasteuria* spp. (Williams, 1967; Santos, 1981; Inserra, Oostendorp e Dickson, 1992; Hewlett et al., 1994; Noel e Stanger, 1994; Ko et al., 1995; Elekçiouglu, 1995). Atualmente, segundo Ciancio et al. (1994), 236 espécies de nematóides pertencentes a 102 gêneros e 10 ordens, encontrados em 68 países de todos os continentes, exceto a Antártida já foram listados como hospedeiros de *Pasteuria* spp. A bactéria foi registrada em várias espécies do nematóide das galhas, *M. javanica*, *M. incognita*; *M. arenaria*; *M. hapla* Chitwood; *M. exigua* Goeldi; *M. acrita* Chitwood; *M. acronea*; *M. ardenensis*; *M. graminis*; *M. coffeicola* Lordello e Zamith; *M. naasi*; *M. grahami* e *M. lusitanica*) (Mankau e Imbriani, 1975; Mankau e Prasad, 1977; Sayre e Wergin, 1977; Baeza-Aragon, 1978; Esser, 1980; Page e Bridge, 1985; Stirling, 1985; Abrantes e Vovlas, 1988; Sayre e Starr, 1988; Ciancio et al., 1994), e ao que parece todos os nematóides do solo podem ser hospedeiros de *Pasteuria* spp., não importando sua posição sistemática, hábito alimentar ou tamanho do corpo (Sturham, 1988).

Muitos autores demonstraram a persistência de *Pasteuria* spp. no campo, entretanto, os efeitos da bactéria sobre as densidades populacionais de nematóides ainda não estão completamente elucidados. Na África do Sul, Spaul (1984) encontrou maiores populações de *Meloidogyne* em áreas infestadas por *Pasteuria* sp. Em pomares de kiwi da Espanha, *Pasteuria* sp. não teve grande impacto na redução das densidades de *Meloidogyne* spp. (Verdejo-Lucas, 1992). Entretanto, esses pomares eram jovens e

segundo Stirling e White (1982), as populações da bactéria aumentam no solo com o passar do tempo, passando a exercer um efeito regulatório sobre populações de *Meloidogyne*. Cerca de 50 % de uma população de *Helicotylenchus lobus* encontrada na Califórnia apresentou endósporos aderidos na cutícula por um período de 10 meses, entretanto, não se encontrou nenhuma correlação entre a densidade mensal do nematóide e a percentagem deles infestados pela bactéria (Ciancio, Mankau e Mundo-Ocampo, 1992). Na Flórida, a percentagem de infestação e/ou parasitismo por *Pasteuria* em uma população de *Belonolaimus longicaudatus* permaneceu constante por 16 meses, entretanto, a bactéria não foi capaz de suprimir o nematóide (Giblin-Davis, McDaniel e Bilz, 1990). Na Itália, Ciancio (1995) observou pequenas variações nas densidades populacionais de *Xiphinema diversicaudatum* e a percentagem deles infestados e/ou parasitados em um período de 2 anos. Áreas com pequenas variações nas densidades populacionais e na taxa de infestação e/ou parasitismo com o passar do tempo, representam um indicativo de ocorrência de equilíbrio entre os organismos. O estabelecimento de equilíbrio é uma situação desejável, uma vez que a erradicação dos hospedeiros por inimigos naturais é raramente observada na natureza.

Em microparcels experimentalmente infestadas por *M. arenaria* e *Pasteuria* sp., as densidades populacionais da bactéria aumentaram rapidamente durante três ciclos de culturas anuais (Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1991). Em outro estudo, as densidades populacionais de J₂ de *M. arenaria* não se mostraram diferentes, quando adicionaram-se em microparcels, até 100.000 endósporos/g de solo, entretanto, observou-se uma redução de até 95 % no número de galhas causadas pelo nematóide na cultura do amendoim (Chen et al., 1996). No Japão, Nishizawa (1986) detectou um solo supressivo à reprodução de *Heterodera glycines*. Neste solo, 100% dos J₂ extraídos estavam infestados com endósporos de *Pasteuria* sp. e 84,4% dos cistos estavam cheios de endósporos da bactéria. Em 1987, o autor relatou também o fenômeno de declínio da população de *Heterodera elachista*, o nematóide de cisto dos cereais. Em experimentos instalados para estudar o efeito deste nematóide sobre a cultura do arroz, observou-se que a população do nematóide cresceu exponencialmente por 4 anos e depois sofreu

uma redução drástica. Nenhum outro fator a não ser a presença de *Pasteuria* sp. foi encontrado para justificar tal fenômeno.

2.5 Produção e Quantificação de Inóculo de *Pasteuria* spp.

Apesar de todos os conhecimentos adquiridos a respeito das bactérias do “grupo *Pasteuria penetrans*” e de seu indiscutível êxito como agente de controle biológico de nematóides, poucos avanços foram alcançados quanto à sua produção em escala comercial.

Os primeiros pesquisadores utilizaram solo infestado com endósporos como fonte de inóculo de *Pasteuria* (Mankau, 1975a; Mankau e Imbriani, 1975). Este material, além de demandar muito tempo para produzir, apresentava vários inconvenientes no que diz respeito ao transporte e manuseio (Mankau e Prasad, 1977). Stirling e Wachtel (1980) demonstraram que o inóculo de isolados de *Pasteuria* parasitas de nematóides das galhas poderia ser obtido de raízes infestadas. Esses pesquisadores utilizaram raízes de tomateiro altamente infestadas por fêmeas de *Meloidogyne* parasitadas por *Pasteuria*, obtidas a partir da inoculação dessas plantas com grandes quantidades de J₂ infestados com endósporos da bactéria. Após 7 ou 8 semanas as raízes foram coletadas, secas ao ar e moídas até passarem por uma peneira de 710 µm. Este pó, algumas vezes contendo até 2×10^9 endósporos/g de raiz, segundo estimativas dos autores, ou 500 fêmeas de *Meloidogyne*, cada uma contendo uma média de 4×10^6 endósporos, em um grama de raiz seca, serviu como fonte de inóculo de *Pasteuria*. Atualmente este método é extensivamente usado para a produção de inóculo para propósitos experimentais. Sharma e Stirling (1991) conseguiram aumentar a produção do inóculo neste sistema a partir do cultivo de tomateiros com raízes infestadas em bandejas. As raízes e o pó produzidos nestes sistemas “in vivo” são de fácil manuseio e armazenamento. Preparações armazenadas por 6 meses em temperatura ambiente permaneceram com a infectividade inalterada (Stirling e Wachtel, 1980). Outros sistemas de produção “in

vivo” podem ser utilizados para a produção de inóculo puro de *Pasteuria*, principalmente para estudos de laboratório. Foram descritos sistemas constituídos de *M. incognita*, *Pasteuria* sp. e raízes excisadas de tomateiro (Verdejo e Mankau, 1986); *M. javanica*, *Pasteuria* sp. e raízes de tomate ou batata transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* strain 4 (Verdejo e Jaffe, 1988), possibilitando o estudo dos fatores envolvidos na interação parasito-hospedeiro, devido ao controle facilitado das variáveis ambientais. Um sistema hidropônico de cultivo foi descrito por Serracin et al. (1994) e utilizado para o estudo do efeito da temperatura sobre a produção de endósporos de *Pasteuria* sp. em raízes de tomateiro infestadas com *M. arenaria* raça 2. Ciancio et al. (1994) cultivaram isolados de *Pasteuria* dos nematóides de vida livre, *Eucephalobus* sp. e *Aphelenchoides rutgersi* em placas de Petri contendo fungos ou bactérias como base alimentar dos nematóides, entretanto, esses nematóides foram extintos pela bactéria em 2-3 meses após a inoculação.

Devido ao fato do hiperparasita ser altamente fastidioso, inúmeras tentativas de cultivo “in vitro” de endósporos ou estádios vegetativos foram infrutíferas (Sayre e Starr, 1985). Willians et al. (1989) inocularam endósporos e estádios vegetativos de *Pasteuria* em 42 meios simples e complexos, com diferentes condições de crescimento e não observaram germinação de endósporos ou crescimento vegetativo. Alguns pesquisadores conseguiram cultivar *Pasteuria* em meios artificiais, entretanto, o crescimento foi mínimo e o desenvolvimento cessou após um limitado número de transferências (Reise et al., 1988). Reise, Hackett e Huettel (1991) mantiveram um isolado de *Pasteuria*, específico para nematóides de cisto, por oito meses em um meio complexo constituído de 111 ingredientes, sendo observados todos os estádios do ciclo da bactéria, entretanto, esse crescimento cessou após a 6ª transferência.

Em nematóides ectoparasitas, ocorre uma produção de endósporos pequena, quando comparada com os endoparasitas, sendo uma grande barreira para o estudo destes isolados. Dessa forma, os espécimens com endósporos no interior do corpo devem ser extraídos do solo e coletados para a preparação da suspensão de endósporos.

Em *Belonolaimus longicaudatus* foram obtidos de 364 a 2.128 endósporos por espécimen (Giblin-Davis, McDaniel e Bilz, 1990).

Dentre todos os sistemas de produção de inóculo vistos anteriormente, o cultivo “in vitro” parece ser a alternativa mais atrativa em termos quantitativos, visto que a partir dos outros métodos não é possível a obtenção de grandes quantidades de endósporos para a utilização em grandes áreas.

O inóculo de *Pasteuria* spp. obtido através de raízes moídas apresenta diferentes concentrações de endósporos. Uma quantificação precisa do inóculo é de grande importância para a padronização das quantidades empregadas nos experimentos. Vários métodos para a quantificação de inóculo de *Pasteuria* em raízes tem sido utilizados (Sharma e Stirling, 1991; Chen, Dickson e Hewlett, 1996). Esses métodos são geralmente baseados na trituração das raízes e posterior contagem dos endósporos em câmara de Newbauer. Stirling e Wachtel (1980) desenvolveram o primeiro método para a quantificação de endósporos em raízes, no qual, o inóculo, constituído de raízes secas e moídas de tomateiro foram trituradas em almofariz contendo água e os fragmentos passados em peneira de 25 µm, sendo os endósporos contados em câmara de Newbauer. Sharma e Stirling (1993) deixaram o pó obtido de raízes de tomateiro embebido em 2 ml de solução de clariphase^(R) (4g/100ml) por 3 horas. O material foi então moído por 5 minutos em almofariz, diluído em 50ml de água e contado em câmara de Newbauer. A eficiência deste método foi estimada em 100 %, principalmente devido a eliminação da passagem dos detritos por peneiras, o que, segundo os autores, diminui a eficiência do método.

A quantificação de inóculo no solo tem sido feita através de bioensaios, que são métodos indiretos, e também através de centrifugação diferencial, que constitui um método direto. Nos bioensaios, solos infestados com endósporos são incubados com nematóides hospedeiros sadios, sendo avaliado o número de endósporos aderidos na cutícula e a percentagem de infestação após um período de incubação (Slana e Sayre, 1981; Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1988), podendo os resultados serem interpretados em curvas-padrão de concentração de endósporos. Métodos indiretos

requerem uma associação compatível entre a bactéria e o nematóide. A centrifugação diferencial elimina o problema de compatibilidade, entretanto, apresenta-se altamente trabalhosa e não adaptada para análises de rotina. Davies et al., (1990) utilizaram a centrifugação diferencial para a quantificação de endósporos no solo e estimaram sua eficiência em 59 %.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, I.M.O.; VOVLAS, N. A note on parasitism of the phytonematodes *Meloidogyne* sp. and *Heterodera fici* by *Pasteuria penetrans*. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v.66, p.2852-2854, 1988.
- AFOLABI, P.; DAVIES, K.G.; O'SHEA, P.S. The eletrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.244-249, Sept. 1995.
- ALLEN, M.W. *Aphelenchoides megadorus*, a new species of Tylenchoidea (Nematoda). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v.8, n.1, p.21-23, Jan. 1941.
- ALLEN, M.W. A new species of the genus *Dolichodorius* (Nematoda: Tylenchida) from California. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v.24, n.2, p.95-98, July 1957.
- BAEZA-ARAGÓN, C. A. Parasitismo de *Bacillus penetrans* en *Meloidogyne exigua* estabelecido en *Coffea arabica*. **Cenicafé**, Chinchiná, v.29, n.3, p.94-97, jul./set. 1978.
- BIRCHFIELD, W.; ANTONOPOULOS, A .A. Scanning electron microscopic observations of *Duboscqia penetrans* parasitizing root-knot larvae. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.8, n.3, p.272-273, July 1976.
- BIRD, A. F. The influence of the actinomycete, *Pasteuria penetrans*, on the host-parasite relationship of the plant-parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. **Parasitology**, Cambridge, v.93, p.571-580, 1986.

- BIRD, A. F.; BRISBANE, P.G.; McCLURE, S.G.; KIMBER, R.W.L. Studies on the properties of the spores of some populations of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.55, n.2, p.169-178, Mar. 1990.
- BROWN, S.M.; SMART Jr., G.C. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.17, n.2, p.123-126, Apr. 1985.
- CAMPOS, V.P. **Controle Biológico de Nematóides**. Lavras: ESAL, 1989. 34 p. (Apostila).
- CANNING, E.U. Protozoal parasites as agents for biological control of plant-parasitic nematodes. **Nematologica**, Leiden, v.19, n.3, p.342-348, Sept. 1973.
- CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W.; HEWLETT, T.E. Quantification of endospore concentrations of *Pasteuria penetrans* in tomato root material. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.28, n.1, p.50-55, Mar. 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, v.28, n.2, p.159-168, June 1996.
- CIANCIO, A. Density-dependent parasitism of *Xiphinema diversicaudatum* by *Pasteuria penetrans* in a naturally infested field. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.2, p.144-149, Feb. 1995.
- CIANCIO, A.; MANKAU, R.; MUNDO-OCAMPO, M. Parasitism of *Helicotylenchus lobus* by *Pasteuria penetrans* in naturally infested soil. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.1, p.29-35, Mar. 1992.
- CIANCIO, A.; BONSIGNORE, R.; VOVLAS, N.; LAMBERTI, F. Host records and morphometrics of *Pasteuria penetrans* group parasites of nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.63, n.3, p.260-267, May 1994.
- CIANCIO, A.; ROCCUZZO, G. Observations on a *Pasteuria* sp. parasitic in *Tylenchulus semipenetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.38, n.4, p.403, Sept. 1992. (Resumos)

- DAVIES, K.G.; DANKS, C. Inter-specific differences in the nematode surface coat between *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* related to the adhesion of the bacterium *Pasteuria penetrans*. **Parasitology**, Cambridge, v.105, p.475-480, 1992.
- DAVIES, K.G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v.112, n.3, p.491-501, June 1988.
- DAVIES, K. G.; LAIRD, V. E. KERRY, B. R. The mobility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v.14, n.4, p. 611-618, oct. 1991.
- DAVIES, K.G.; FLYNN, C.A.; LAIRD, V.E.; KERRY, B.R. The life-cycle, population dynamics and host specificity of a parasite of *Heterodera avenae*, similar to *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v.13, n.3, p. 303-309, juil. 1990.
- DAVIES, K.G.; REDDEN, M.; PEARSON, T.K. Endospore heterogeneity in *Pasteuria penetrans* related to adhesion to plant-parasitic nematodes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.19, n.5, p.370-373, Nov. 1994.
- DAVIES, K.G.; ROBINSON, M.P.; LAIRD, V.E. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.59, n.1, p.18-23, Jan. 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, n.2, p.241-244, dic. 1992.
- DUBE, B.N. Integrated application of *Paecilomyces lilacinus*, *Pasteuria penetrans* and cattle manure for control of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.26, n.4, p.542, Oct. 1994. (Resumos)
- DUBE, B.N.; SMART JR., G.C. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.19, n.2, p.222-227, Apr. 1987.

- DUTKY, E.M.; SAYRE, R.M. Some factors affecting infection of nematodes by bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.10, n.4, p.285, Oct. 1978. (Resumos)
- ELEKÇIOUGLU, I.H. Occurrence of *Pasteuria* bacteria as parasites of plant-parasitic nematodes in the east mediterranean region of Turkey. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.23, n. 2, p.213-215, dic. 1995.
- ESSER, R.P. **A bacterial spore parasite of nematodes**. Gainesville: Fla. Dept. Agric. & Consumer Services, 1980. 3p. (Nematology circular n. 63).
- FATTAH, F.A.; SALEH, H.M.; ABOUD, H.M. Parasitism of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by *Pasteuria penetrans* in Iraq. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.21, n.3, p.431-433, July 1989.
- GIBLIN-DAVIS, R.M.; McDANIEL, L.L.; BILZ, F.G. Isolates of the *Pasteuria penetrans* group from phytoparasitic nematodes in bermudagrass turf. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.22, n.4, p.750-762, Oct. 1990. (Suplemento)
- HATZ, B.; DICKSON, D.W. Effect of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.4, p.512-521, Dec. 1992.
- HEWLETT, T.E.; COX, R.; DICKSON, D.W.; DUNN, R.A. Occurrence of *Pasteuria* sp. in Florida. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.26, n.4, p.616-619, Dec. 1994. (Suplemento)
- IMBRIANI, J.L.; MANKAU, R. Ultrastructure of the nematode pathogen, *Bacillus penetrans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.30, n.3, p.337-347, Nov. 1977.
- INSERRA, R.N.; OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W. *Pasteuria* sp. parasitizing *Troponema okamotoi* in Florida. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.1, p.36-39, Mar. 1992.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p.453-489, 1986.

- KO, M.P.; BERNARD, E.C.; SCHMITT, D.P.; SIPES, B.S. Occurrence of *Pasteuria*-like organisms on selected plant-parasitic nematodes of pineapple in the Hawaiian islands. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.27, n.3, p.395-408, Sept. 1995.
- LORDELLO, L.G.E. Dois novos nematóides do solo da família Dorilaimidae. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.41, n.3, p.109-116, set. 1966 a.
- LORDELLO, L.G.E. Nota sobre um parasito de nematóide. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.41, n.2, p.67-69, jun. 1966 b.
- LORDELLO, L.G.E. *Xiphinema campinense*, nova espécie (Nematoda, Dorylaimidae). **Bragantia**, Campinas, v.11, n.10-11, 313-316, out./dez. 1951.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das Plantas Cultivadas**. 8.ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314p.
- MANKAU, R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing virulent disease of plant-parasitic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.26, n.3, p.333-339, Nov. 1975 a.
- MANKAU, R. Prokaryote affinities of *Duboscqia penetrans* Thorne. **Journal of Protozoology**, Lawrence, v.22, n.1, p.31-34, 1975 b.
- MANKAU, R. Biological control of nematodes pests by natural enemies. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v.18, p.415-440, 1980.
- MANKAU, R.; IMBRIANI, J.L. The life cycle of an endoparasite in some tylenchid nematodes. **Nematologica**, Leiden, v.21, n.1, p.89-94, Mar. 1975.
- MANKAU, R.; IMBRIANI, J.L.; BELL, A.H. SEM observations on nematode cuticle penetration by *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.8, n.2, p.179-181, Apr. 1976.
- MANKAU, R.; PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. **Journal of nematology**, Lakeland, v.9, n.1, p.40-45, Jan. 1977.
- METCHNIKOFF, E. *Pasteuria ramosa*, un représentant des bactéries à division longitudinale. **Annales d'Institute Pasteur**, Paris, v.2, p.165-170, 1888.

- MOUSA, E.M. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.23, n.4, p.542, Oct. 1991. (Resumos)
- NISHIZAWA, T. On strain of *Pasteuria penetrans* parasitic to cyst nematodes. *Revue de Nématologie*, Montrouge Cedex, v.9, n.3, p.303-304, nov. 1986. (Resumos)
- NOEL, G.R.; STANGER, B.A. First report of *Pasteuria* sp. attacking *Heterodera glycines* in North America. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.26, n.4, p.612-615, Dec. 1994. (Suplemento)
- NOVARETTI, W.R.T. Controle biológico de nematóides fitopatogênicos. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. Cap. 18, p.273-283.
- O'BRIEN, P.C. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.12, n.4, p.234, Oct. 1980. (Resumos)
- OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Soil bioassay and host specificity of populations of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.26, n.4, p.654, Oct. 1988. (Resumos)
- 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, v.22, n.4, p.525-531, Oct. 1990.
- OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.23, n.1, p.58-64, Jan. 1991.
- PAGE, S.L.J.; BRIDGE, J. Observations on *Pasteuria penetrans* as a parasite of *Meloidogyne acronea*. *Nematologica*, Leiden, v.31, n.2, p.238-240, Apr. 1985.
- PRASAD, N.; MANKAU, R. Studies on a sporozoan endoparasite of nematodes. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.1, n.4, p.301-302, Oct. 1969. (Resumos)
- RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R.; HAGUE, N.G.M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. *Nematologia Mediterranea*, Bari, v.19, n.2, p.225-227, dic. 1991.

- REISE, R. W.; HACKETT, K.T.; HUETELL, R.N. Limited cultivation of *Pasteuria nishizawae*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.23, n.4, p.547-548, Oct. 1991. (Resumos)
- REISE, R. W.; HACKETT, K.T.; SAYRE, R.M.; HUETELL, R.N. Factors affecting cultivation of three isolates of *Pasteuria* spp. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.20, n.4, p.657, Oct. 1988. (Resumos)
- SANTOS, J.M. Ocorrência de *Bacillus penetrans* parasitando *Meloidogyne javanica* (Nematoda:Meloidogynidae) no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.6, n.4, p.519-522, out. 1981.
- SAYRE, R.M. Promising organisms for biological control of nematodes. *Plant Disease*, St. Paul, v.64, n.6, p.526-532, June 1980.
- SAYRE, R.M.; STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. *Proceedings of Helminthological Society of Washington*, Washington, v.52, n.2, p.149-165, Jan. 1985.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P.; DAVIS, R.E. Occurrence in *Monia rectirostris* (Cladocera: daphnidae) of a parasite morphologically similar to *Pasteuria ramosa* (Metchnikoff, 1888). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.23, p.1573-1579, 1977.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.129, n.2, p.1091-1101, 1977.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P.; SCHMIDT, J.M.; STARR, M.P. *Pasteuria nishizawae* sp. nov., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. *Research in Microbiology*, Paris, v.142, p.551-564, 1991.
- SAYRE, R.M.; STARR, M.P.; GOLDEN, A.; WERGIN, W.P.; ENDO, B.Y. Comparison of *Pasteuria penetrans* from *Meloidogyne incognita* with a related mycelial and endospore-forming bacterial parasite from *Pratylenchus brachyurus*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, Washington, v.55, n.1, p.28-49, Jan. 1988.

- SERRACIN, M.; SCHUERGER, A.C.; DICKSON, D.W.; WEINGARTNER, D.P.; HEWLETT, T. An alternative method for culturing *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.26, n.4, p.565, Oct. 1994. (Resumos)
- SHARMA, R.D.; STIRLING, G.R. "In vivo" mass production systems for *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, Leiden, v.37, n.4, p.483-485, Sept. 1991.
- SHARMA, R.D.; STIRLING, G.R. A method for the extraction and quantification of *Pasteuria penetrans* spores in root material. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, n.1, p.110-111, mar. 1993.
- SLANA, L.J.; SAYRE, R.M. A method for measuring incidence of *Bacillus penetrans* spore attachment to the second-stage larvae of *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.13, n.4, p.461, Oct. 1981. (Resumos)
- STARR, M.P.; SAYRE, R.M. *Pasteuria thornei* sp. nov and *Pasteuria penetrans sensu stricto* emend., mycelial and endospore forming bacteria parasitic, respectively, on plant parasitic nematodes of genera *Pratylenchus* and *Meloidogyne*. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, Paris, v.139, n.1, p.11-31, 1988.
- SIDDIQI, M. *Mumtazium mumtazae* n. gen., n. sp. (Nematoda: Tylencholaimidae) with the proposal of *Laimydorus* n. gen. (Thornenematidae). *Nematologica*, Leiden, v.15, n.2, p.234-240, May 1969.
- SIDDIQI, M.R.; HOOPER, D.J.; KHAN, E. A new nematode genus *Paralongidorus* (Nematoda: Dorylaimoidea) with descriptions of two new species and observations on *Paralongidorus citri* (Siddiqi 1959) n. comb. *Nematologica*, Leiden, v.9, n.1, p.7-14, June 1963.
- SPAULL, V.W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. *Revue de Nématologie*, Montrouge Cedex, v.7, n.3, p.277-282, avr. 1984.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, St. Paul, v.74, n.1, p.55-60, Jan. 1984.
- STIRLING, G.R. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Nematologica*, Leiden, v.27, n.4, p.458-462, Dec. 1981.

- STIRLING, G.R. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. *Nematologica*, Leiden, v.31, n.2, p.203-209, Apr. 1985.
- STIRLING, G.R. **Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects**. 1 ed. Melksham: Redwood Press, 1991. 282p.
- STIRLING, G.R.; BIRD, A.F.; CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie*, Montrouge Cedex, v.9, n.3, p.251-260, Nov. 1986.
- STIRLING, G.R., WHITE, A.M. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australia vineyards. *Plant Disease*, St. Paul, v.66, n.1, p.52-53, Jan. 1982.
- STIRLING, G.R., WACHTEL, M.G. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*, Leiden, v.26, p.308-312, June, 1980.
- STURHAM, D. New host and geographical records of nematode-parasitic bacteria of the *Pasteuria penetrans* group. *Nematologica*, Leiden, v.34, n.4, p.350-356, Sept. 1988.
- STURHAM, D.; WINKELHEIDE, R.; SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Light and electron microscopical studies of the life cycle and developmental stages of *Pasteuria* isolate parasitizing the pea cyst nematode, *Heterodera goettingiana*. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge Cedex, v.17, n.1, p.29-42, jan. 1994.
- THORNE, G. *Duboscqia penetrans*, n. sp. (Sporozoa, Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. **Proceedings Helminthological Society of Washington**, Washington, v.7, n.1, p.51-53, Jan. 1940.
- TIHOHOD, D. **Nematologia Agrícola Aplicada**. 1 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372p.
- 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**, Oxford, v.13, n.6, p.455-462, Sept. 1994.
- VERDEJO-LUCAS, S. Seasonal population fluctuations of *Meloidogyne* spp. and the *Pasteuria penetrans* group in kiwi orchards. *Plant Disease*, St. Paul, v.76, n.12, p.1275-1279, Dec. 1992.

- VERDEJO, S.; JAFFEE, B.A. Reproduction of *Pasteuria penetrans* in a tissue culture system containing *Meloidogyne javanica* and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n.10, p.1284-1286, Oct. 1988.
- VERDEJO, S.; MANKAU, R. Culture of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne incognita* on oligoxenic excised tomato root culture. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.18, n.4, p.635, Oct. 1986. (Resumos)
- WALIA, R.K.; BANSAL, R.K.; BHATTI, D.S. A new bacterial parasite (*Pasteuria* sp.) isolated from pigeonpea cyst nematode, *Heterodera cajani*. *International Nematology Network Newsletter*, Raleigh, v.7, n.3, p.30-31, Sept. 1990.
- WALTER, D.E.; KAPLAN, D.T. Antagonists of plant-parasitic nematodes in Florida citrus. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.22, n.4, p.567-573, Oct. 1990.
- WILLIAMS, J.R. Studies on the nematode soil fauna of sugar cane fields in Mauritius. Notes upon a parasite of root-knot nematodes. *Nematologica*, Leiden, v.5, n.1, p.37-42, Mar. 1960.
- WILLIAMS, J.R. Observations on parasitic protozoa in plant-parasitic and free-living nematodes. *Nematologica*, Leiden, v.13, n.3, p.336-342, Nov. 1967.
- WILLIAMS, A.B.; STIRLING, G.R.; HAYWARD, A.C.; PERRY, J. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.67, n.2, p.145-156, June, 1989.

4 CAPÍTULO I

FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DE FITONEMATÓIDES ASSOCIADOS COM
PASTEURLIA SPP. EM TRÊS ÁREAS NATURALMENTE INFESTADAS

RESUMO

SOUZA, Jorge Teodoro de. Flutuação populacional de fitonematóides associados com *Pasteuria* spp. em três áreas naturalmente infestadas. In: ____ **Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides**. Lavras: UFLA, 1997. Cap. 1, p. 30-59. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

Estudou-se, em amostragens mensais, durante o período de um ano, as flutuações populacionais de fitonematóides associados com *Pasteuria* spp. em três áreas naturalmente infestadas. Nas microparcelas instaladas no campo, que constituíram o primeiro local estudado, as densidades de juvenis do segundo estágio (J₂) de uma população mista de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* /100 cm³ de solo variaram de 2 a 5552 (\bar{x} = 560,81), a percentagem de infestação de 0 a 66,67 % (\bar{x} = 20,09) e o número médio de endósporos/J₂ de 1 a 36,5 (\bar{x} = 5,94). Nas raízes de tomateiro coletadas das microparcelas, *M. incognita* consistiu de 86% das fêmeas identificadas e *M. javanica* 14%, sendo que 17,44% e 7,14% das fêmeas de *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente, estavam parasitadas por *Pasteuria* sp. Encontraram-se uma média de 421,25 ± 29,122 fêmeas de *Meloidogyne* spp./g de raiz, sendo que 11,73 ± 1,579 % estavam parasitadas. O número médio de endósporos produzido em cada fêmea foi de 2.270.000 ± 95.035,768. As densidades populacionais de *Pratylenchus brachyurus* no solo variaram de 0 a 56 espécimens/100 cm³ de solo (\bar{x} = 7,13), a percentagem de infestação e/ou parasitismo variou de 0 a 100 % (\bar{x} = 10,38) e o número médio de endósporos/espécimen variou de 1 a 10,5 (\bar{x} = 2,76). As densidades populacionais de *Aphelenchus* sp. no solo variaram de 0 a 88 espécimens/100 cm³ de solo (\bar{x} = 8,73), a percentagem de infestação variou de 0 a 50 (\bar{x} = 0,81) e o número médio de endósporos/espécimen variou de 1 a 8 (\bar{x} = 3,67). Na segunda área estudada, um canteiro plantado com *Heliconia* sp., as densidades de J₂ de *Meloidogyne* sp./100 cm³ de solo variaram de 0 a 68 (\bar{x} = 18,5), a percentagem de infestação dos J₂ variou de 0 a 50 % (\bar{x} = 11,85) e o número médio de endósporos/J₂ de

1,5 a 8 ($\bar{x} = 4,17$). No pomar de citros, que constituiu a terceira área estudada, as densidades de J₂ de *Tylenchulus semipenetrans*/100 cm³ de solo variaram de 18 a 316 ($\bar{x} = 152,5$), a percentagem de infestação e/ou parasitismo em J₂ de 5,26 a 63,64 % ($\bar{x} = 22,73$) e o número de endósporos/J₂ de 1 a 5,62 ($\bar{x} = 2,94$). O número de machos adultos/100 cm³ de solo variou de 0 a 24 ($\bar{x} = 4,41$), a percentagem de infestação e/ou parasitismo em machos variou de 0 a 100 % ($\bar{x} = 18,62$) e o número de endósporos/macho variou de 1 a 4 ($\bar{x} = 2,4$). Os resultados obtidos indicam que *Pasteuria* spp. e os nematóides hospedeiros não estavam em equilíbrio nas áreas estudadas.

ABSTRACT

Populacional fluctuations of phytonematodes associated with *Pasteuria* spp. in three naturally infested areas

Population fluctuations of phytonematodes associated with *Pasteuria* spp. were studied in monthly samples from three naturally infested areas over one year. In field microplots, the first studied area, the *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* second stage juveniles (J_2) densities varied from 2 to 5552 $J_2/100\text{ cm}^3$ soil ($\bar{x} = 560.81$), the percentage of infested J_2 from 0 to 66.67 ($\bar{x} = 20.09$) and the mean number of endospores/ J_2 from 1 to 36.5 ($\bar{x} = 5.94$). In tomato roots collected from microplots, *M. incognita* accounted for 86% of identified females and *M. javanica* 14%. Seventeen and seven percent, respectively of those females of *M. incognita* and *M. javanica*, respectively, were parasitized by *Pasteuria* sp. A mean of 421.25 ± 29.122 *Meloidogyne* spp. females/g of root was found, but 11.73 ± 1.579 % of those females were parasitized. The average number of endospores produced per female was 2270000 ± 95035.768 . The populational densities of *Pratylenchus brachyurus* in soil varied from 0 to 56 ($\bar{x} = 7.13$) especimens/ 100 cm^3 soil, but the percentage of infestation and/or parasitism varied from 0 to 100 % ($\bar{x} = 10.38$) and the average number of endospores/especimen from 1 to 10.5 ($\bar{x} = 2.76$). The populational densities of *Aphelenchus* sp. in soil varied from 0 to 88 ($\bar{x} = 8.73$), the percentage of infestation from 0 to 50 ($\bar{x} = 0.81$) and the average number of endospores/especimen from 1 to 8 ($\bar{x} = 3.67$). In the second studied area, a plot cultivated with *Heliconia* sp., had *Meloidogyne* sp. J_2 densities varing from 0 to 68 ($\bar{x} = 18.5$), the J_2 percentage of infestation from 0 to 50% ($\bar{x} = 11.85$) and the average number of endospores/ J_2 from 1.5 to 8 ($\bar{x} = 4.17$). In a *Citrus* sp. orchard, the third studied area, the J_2 of *Tylenchulus semipenetrans* populational densities / 100 cm^3 soil varied from 18 to 316 ($\bar{x} = 152.5$), but the percentage of infestation and/or parasitism in J_2 varied from

5.26 to 63.64 % ($\bar{x} = 22.73$) and the average number of endósporos/ J_2 from 1 to 5.62 ($\bar{x} = 2.94$). The densities of adult males/100 cm³ soil varied from 0 to 24 ($\bar{x} = 4.41$), the males percentage of infestation and/or parasitism from 0 to 100 ($\bar{x} = 18.62$) and the average number of endospores/male from 1 to 4 ($\bar{x} = 2.4$). The results showed that bacteria and nematode hosts was not in equilibrium in the monitored areas.

4.1 INTRODUÇÃO

As bactérias do “grupo *Pasteuria penetrans*” (Thorne) Sayre e Starr são parasitas obrigatórias de nematóides (Mankau, 1975) e têm se mostrado amplamente distribuídas (Ciancio et al., 1994). Esses patógenos apresentam um relativo grau de especificidade (Stirling, 1985; Davies, Kerry e Flynn, 1988), de forma que um determinado isolado da bactéria é capaz de parasitar apenas um restrito grupo de nematóides hospedeiros.

Tem-se demonstrado a persistência de *Pasteuria* em plantações infestadas por nematóides. Entretanto, os efeitos dessa bactéria sobre as populações de fitonematóides ainda não são entendidos com profundidade. A bactéria parece estar em equilíbrio com as populações de *Belonolaimus longicaudatus* Rau, (Giblin-Davis, McDaniel e Bilz, 1990), *Helicotylenchus lobus* Sher (Ciancio, Mankau e Mundo-Ocampo, 1992) na Flórida, *Heterodera avenae* Woll. (Davies et al., 1990) na Inglaterra e *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne (Ciancio, 1995) na Itália. No Sul da África, Spaull (1981), encontrou maiores densidades populacionais de *Meloidogyne* Goeldi em campos onde a bactéria ocorria juntamente com o nematóide. No Japão, Nishizawa (1986, 1988) relatou a ocorrência de isolados de *Pasteuria* que causaram o declínio das populações de *Heterodera elachista* Oshima em arroz e *H. glycines* Ichinohe em soja. No Brasil esses estudos ainda são escassos, mas as flutuações populacionais de nematóides e da bactéria em condições naturais podem nos fornecer importantes informações a respeito da dinâmica parasito-hospedeiro.

Com este estudo objetivou-se descrever as flutuações populacionais de algumas espécies de fitonematóides naturalmente associados com *Pasteuria* spp. em três áreas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados três locais com *Pasteuria* spp. associada naturalmente a fitonematóides de importância econômica para a amostragem mensal e estudo da flutuação populacional.

A primeira área constituiu-se de 20 microparcelas delimitadas lateralmente por fibra de vidro de 80 cm de diâmetro e 80 cm de profundidade, onde foram plantadas duas mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill var. Rey de Los Tempranos). Nessa área, localizada anexa ao Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras, MG, *Pasteuria* sp. estava associada naturalmente a *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *M. javanica* (Kofoid e White) Chitwood, *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev e Stekhoven e *Aphelenchus* Bastian. O primeiro plantio (julho/1995) foi feito visando o estabelecimento dos fitonematóides e do parasito. Posteriormente, seguiram-se três outros plantios (novembro/95; março/1996 e julho/1996), garantindo a disponibilidade de alimento para os fitonematóides durante o período estudado. Nessas microparcelas, foram coletadas 20 amostras/mês, abrangendo o período de dezembro de 1995 a novembro de 1996, sendo a data de amostragem fixada para todo dia 25 do mês correspondente. As amostras constituíram-se de 500 cm³ de solo e quatro subamostras, retiradas de 10 a 20 cm do caule dos tomateiros (2 amostras/planta), à profundidade de 0-35 cm. As amostras de solo coletadas mensalmente nas microparcelas foram acondicionadas em sacos plásticos e imediatamente processadas através da técnica de Jenkins (1964). As suspensões obtidas foram examinadas em

caixas de contagem sob microscópio de objetivas invertidas a 125 e 250X, onde determinou-se mensalmente o número de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne* spp./100 cm³ de solo, número de J₂ de *Meloidogyne* spp. infestados por *Pasteuria* sp., número de endósporos/J₂, número de *P. brachyurus* e *Aphelenchus* sp./100 cm³ de solo, número deles infestados ou parasitados por *Pasteuria* spp. e o número de endósporos/espécimen, bem como o número de espécimens de fitonematóides pertencentes a outros gêneros. Os nematóides eram considerados infestados quando se observava a presença de no mínimo um endósporo de *Pasteuria* spp. aderido à cutícula e parasitados, quando se observava a presença de endósporos ou outra fase do ciclo de vida da bactéria no interior do corpo do nematóide. Após a última amostragem (25/11/96), as raízes dos tomateiros foram colhidas e armazenadas para serem utilizadas como fonte de inóculo de *Pasteuria* em outros estudos. Uma amostra de solo obtida através da homogeneização das amostras coletadas das 20 microparcelsas em 25/10/96 e analisada no Departamento de Ciência dos Solos (DCS)/UFLA, apresentou as seguintes características: pH em água - 6,8; Carbono - 2,5%; matéria orgânica - 4,3%; areia - 42%; limo - 34% e argila - 24%. A medição dos endósporos foi realizada após o exame, em microscópio, dos espécimens associados com *Pasteuria* obtidos do solo nos três primeiros meses do estudo (dezembro/95; janeiro/96 e fevereiro/96). Para isto os espécimens com endósporos foram fixados em TAF, impregnados em glicerina e montados em lâminas permanentes, conforme Campos (1993). Um micrômetro ocular de fio médio (Olympus OSM 215038) acoplado a um microscópio a 250 e 500X foi utilizado para a obtenção das medidas de diâmetro e altura dos endósporos aderidos na cutícula de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne* spp. As avaliações de parasitismo, quantidade de fêmeas nas raízes e número de endósporos foram realizadas em raízes frescas de tomateiro colhidas das microparcelsas em 25/11/96. Através do método de dissecação, fêmeas de *Meloidogyne* spp. foram retiradas das raízes e dispostas lado a lado em gotas de água sobre lâmina, cobertas com lamínula (24 x 50mm) e posteriormente esmagadas, sendo a configuração perineal analisada segundo os padrões contidos em Taylor e Sasser (1978) e registrado o número de fêmeas

parasitadas por *Pasteuria*. Foram consideradas parasitadas as fêmeas que apresentavam endósporos ou qualquer outra fase do ciclo da bactéria no interior do corpo. Das raízes frescas, contendo fêmeas de *Meloidogyne* parasitadas, pesaram-se 20 amostras de um grama, as quais foram colocadas em vidros com capacidade para 50ml, onde permaneceram por três dias imersas em 15 ml de solução de citolase 50% (Genencor International, Rochester, NY) a 4 °C. Após este período, as raízes foram separadas da solução de citolase com a ajuda de uma peneira de 60 malhas, batidas por 10 minutos em agitador e o macerado obtido foi passado em peneiras de 20 e 150 malhas. As fêmeas, que se encontravam no material recolhido da peneira de 150 malhas foram contadas, e posteriormente esmagadas entre lâmina e lamínula para a avaliação do parasitismo, obtendo-se, dessa forma, o número de fêmeas/g de raiz e a percentagem de fêmeas parasitadas. Raízes contendo fêmeas parasitadas foram cortadas em pedaços de 2 cm, imersas em solução de citolase e coletadas, como descrito anteriormente. As fêmeas com maior probabilidade de estarem parasitadas, ou seja, com coloração branco-leitosa e volume aumentado, foram separadas e usadas para a quantificação de endósporos. Para tanto, esmagou-se cada fêmea em 1 ml de água destilada em triturador de tecidos (Pyrex 7727-15) previamente lavado com leite desnatado e enxaguado com água destilada, evitando-se, desta forma, a adesão de endósporos nas paredes do instrumento. Os endósporos liberados por fêmea foram quantificados em câmara de Neubauer a 500X. Os dados mensais referentes ao número de J_2 de *Meloidogyne* spp./100 cm³ de solo, percentagem de J_2 infestados e número médio de endósporos/ J_2 foram inicialmente submetidos à análise de variância, considerando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 20 repetições e a análise de correlação (r). Posteriormente, fez-se a análise de regressão para os meses com o objetivo de se ajustar aos dados uma equação de regressão para a flutuação de J_2 no solo, bem como a percentagem de infestação e o número médio de endósporos/ J_2 . Utilizou-se um modelo linear harmônico, no qual a variável x é substituída por funções trigonométricas. O ajuste das equações foi verificado através dos valores de R² e pela técnica de análise de resíduos (Neter, Wasserman e Kutner, 1990). As análises foram

processadas no SAS System 6.10. O número de fêmeas/g de raiz e a percentagem de parasitismo no último mês do estudo foram submetidas à análise de correlação. Os dados referentes ao número de *Pratylenchus* sp. ou *Aphelenchus* sp./100 cm³ de solo, percentagem deles infestados e/ou parasitados e o número médio de endósporos/espécimen não foram submetidos a análise de variância devido à alta frequência de valores nulos, o que impossibilitou a análise, sendo esses dados analisados graficamente. Os dados climáticos referentes à temperatura (°C) e umidade relativa (%) médias dos 5 dias anteriores a cada amostragem, a precipitação (mm) acumulada nos 5 dias anteriores a cada amostragem, juntamente com o número médio de J₂ de *Meloidogyne* spp. ou espécimens de *Pratylenchus* sp./100 cm³ de solo, percentagem deles infestados e/ou parasitados e o número médio de endósporos/espécimen foram submetidos à análise de correlação, objetivando-se estudar o efeito desses fatores climáticos sobre os nematóides e as bactérias em um período posterior a sua ocorrência. Os coeficientes de correlação de Pearson foram obtidos utilizando-se o sistema SAEG 5.0 (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas). Os dados climáticos diários foram obtidos na seção de climatologia da UFLA, sendo a estação meteorológica localizada a aproximadamente 500 m da primeira área e 600 m da segunda área, que será descrita a seguir.

A segunda área amostrada constituiu-se de um canteiro (5 m²) cultivado com uma planta ornamental, *Heliconia* sp., naturalmente infestada com *Pasteuria* sp. e *Meloidogyne* sp., localizado na seção de Floricultura e Paisagismo do Departamento de Agricultura (DAG) da UFLA, Lavras-MG. Neste local foi coletada uma amostra por mês, de dezembro de 1995 a novembro de 1996, sempre no dia 30 de cada mês. A amostra constituiu-se de 1000 cm³ de solo e oito subamostras retiradas da rizosfera das plantas, à uma profundidade de 0-35 cm. A amostra foi processada e analisada conforme descrito anteriormente, determinando-se mensalmente o número de J₂ de *Meloidogyne* sp./100 cm³ de solo, número de J₂ de *Meloidogyne* sp. infestados por *Pasteuria* sp. e o número de espécimens de outros gêneros de fitonematóides presentes. Uma amostra de solo coletada deste local em 30/10/96 foi analisada no Departamento

de Ciências do Solo, UFLA e apresentou as seguintes características: pH em água - 5,9; Carbono - 1,8%; matéria orgânica - 3,1%; areia - 28%; limo - 22% e argila - 50%. Os dados médios mensais do número de $J_2/100\text{ cm}^3$ de solo, percentagem de infestação e número médio de endósporos/ J_2 não foram submetidos a análise de variância devido à ocorrência de muitos valores nulos e também pela falta de repetições. Esses dados foram correlacionados com os dados climáticos que ocorreram 5 dias antes da amostragem, como descrito anteriormente. Não foi feita a análise do parasitismo em fêmeas nem a medição dos endósporos, devido ao baixo número de espécimens associados com *Pasteuria* encontrados nesta área.

A terceira área amostrada constou de um pomar de citros (*Citrus* sp.) infestado naturalmente com *Pasteuria* sp. e *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, localizado na Fazenda Jardim, município de Luminárias, MG. Neste local foram coletadas 2 amostras por mês, de dezembro de 1995 a novembro de 1996, com a data fixada para os dias 5-8 do mês correspondente. As amostras constituíram-se de 500 cm^3 de solo e quatro subamostras colhidas na rizosfera das plantas, a 0-35 cm de profundidade. As amostras foram processadas e analisadas como descrito anteriormente, determinando-se mensalmente o número de J_2 de *T. semipenetrans*/ 100 cm^3 de solo, o número deles infestados e/ou parasitados por *Pasteuria* sp., número médio de endósporos/espécimen, número de machos/ 100 cm^3 de solo; o número deles infestados e/ou parasitados por *Pasteuria* sp., número de endósporos/espécimen, bem como o número de espécimens pertencentes a outros gêneros de fitonematóides presentes. Uma amostra de solo obtida pela homogeneização das amostras coletadas em 7/10/96 e analisada no Departamento de Ciências do Solo, UFLA, apresentou as seguintes características: pH em água - 5,7; carbono - 1,8%; matéria orgânica - 3,1%; areia - 70%; limo - 14%; argila - 16%. A medição de endósporos foi realizada em J_2 e machos de *T. semipenetrans* infestados e/ou parasitados por *Pasteuria* sp. obtidos nos três primeiros meses do estudo (dezembro/95; janeiro/96 e fevereiro/96). Para isto os espécimens foram montados em lâminas permanentes e medidos o diâmetro e a altura dos endósporos como descrito anteriormente. Os dados mensais referentes ao número de J_2 de *T. semipenetrans*/ 100

cm³ de solo, percentagem de infestação e/ou parasitismo e número médio de endósporos/ espécimen foram submetidos a análise de variância e correlação no SAS System 6.10. Os demais dados não foram submetidos à análise de variância devido aos mesmos motivos expostos anteriormente. Esses dados não foram correlacionados com os climáticos devido a ausência dessas informações neste local.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Microparcelas de fibra de vidro cultivadas com tomateiro e infestadas por *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus brachyurus* e *Aphelenchus* sp. associados com *Pasteuria* spp.

Pasteuria spp. foi encontrada em 1995 associada a *M. javanica*, *M. incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Aphelenchus* sp. Em *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, a bactéria foi observada infestando os J₂ que se movimentavam no solo, nos quais podiam ser observados endósporos aderidos em suas cutículas e parasitando as fêmeas que se desenvolviam no interior das raízes, nas quais a bactéria produzia os endósporos. O isolado de *Pasteuria* sp. associado com *M. incognita* e *M. javanica* foi denominado isolado P1-UFLA. Em *P. brachyurus*, a bactéria foi observada infestando e parasitando todos os estádios do nematóide. Os espécimens parasitados, recuperados do solo, apresentavam o corpo visivelmente mais volumoso e total ausência de movimentos. Juvenis e adultos de *Aphelenchus* sp. também foram observados infestados com a bactéria, não sendo possível a comprovação do parasitismo, devido ao pequeno número de espécimens infestados encontrados no solo neste período.

A análise estatística revelou diferenças entre os meses no que se refere ao número médio de J₂ de *Meloidogyne*/100 cm³ de solo e a percentagem de infestação (Figura 3, B e D), não acontecendo o mesmo com o número médio de endósporos/J₂ (Figura 3, F). As equações apresentaram um bom ajuste, o que é confirmado pelos valores de R² e pela

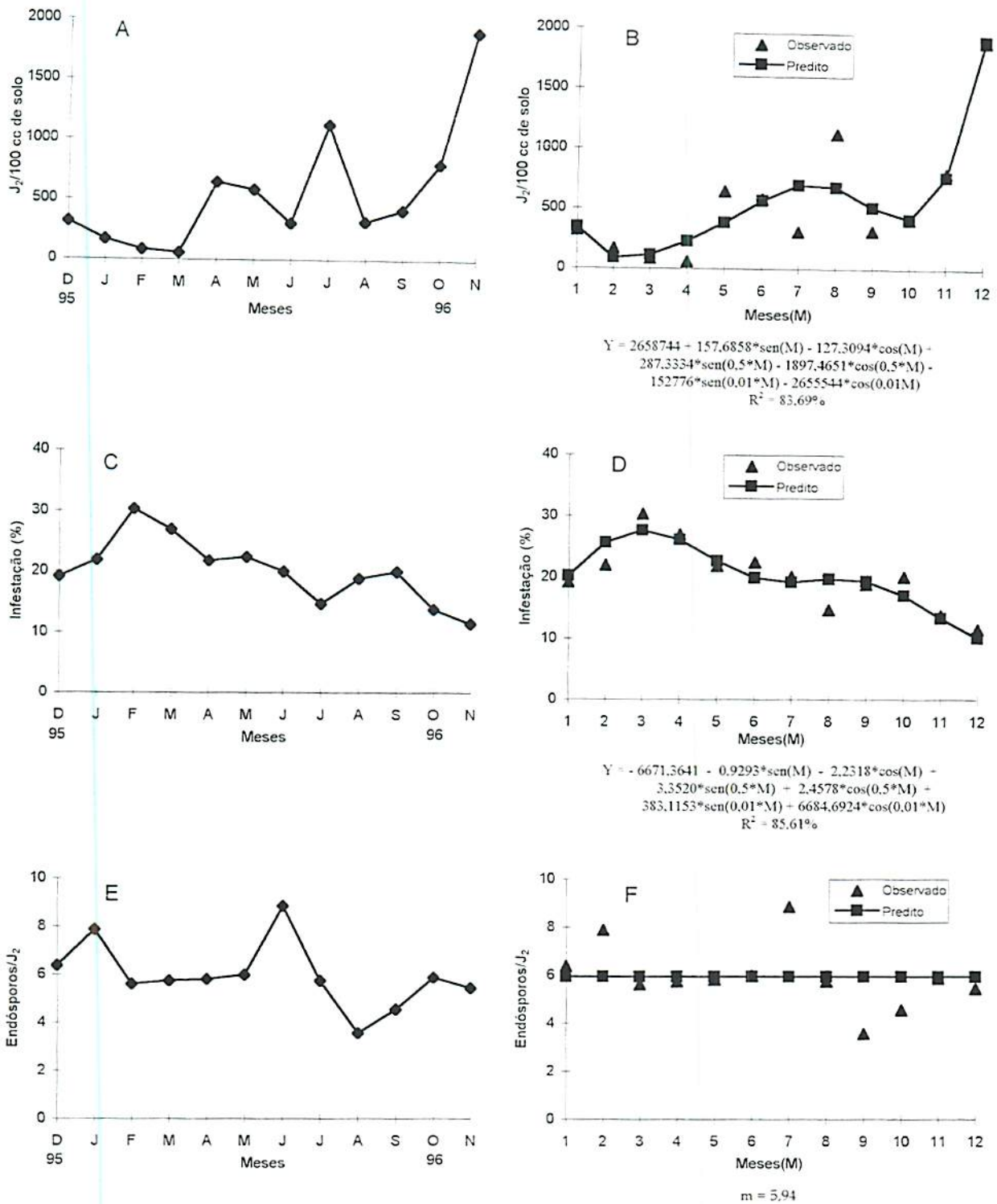


FIGURA 3. Associação de J₂ *Meloidogyne* spp. e *Pasteuria* sp. em microparcelas cultivadas com tomateiro. (A) Densidade populacional de *Meloidogyne* spp./100 cm³ de solo, (B) Curva ajustada aos dados, (C) Percentagem média de endósporos/J₂, (D) Curva ajustada aos dados, (E) Número médio de endósporos/J₂, (F) Curva ajustada aos dados. UFLA, Lavras - MG, 1997.

análise de resíduos, onde 100% dos erros padronizados apresentaram valores entre -1,96 e +1,96 (Neter, Wasserman e Kutner, 1990).

As densidades de $J_2/100 \text{ cm}^3$ de solo variaram de 2 a 5552, com média $560,81 \pm 50,56$ (média \pm erro padrão). Ocorreram altas densidades de J_2 no solo durante o mês de julho, devido a falta de raízes novas neste período, que são os sítios de penetração para os J_2 e também nos meses de outubro e novembro (Figura 3 A), provavelmente devido ao alto nível de infestação em que se encontravam os tomateiros, não sendo também possível a formação de raízes novas. A percentagem de infestação foi de 0 a 66,67, com média $20,09 \pm 0,97$ e o número médio de endósporos/ J_2 de 1 a 36,5, com média $5,94 \pm 0,38$.

Inóculo de J_2 de *Meloidogyne* spp. aumentou no solo a partir de março (Figura 3, A e B), porém, a percentagem de infestação desses juvenis por *Pasteuria* decresceu no mesmo período (Figura 3, C e D), isto talvez devido a uma pequena concentração de endósporos da bactéria no solo, ou seja, o grande número de J_2 no solo pode ter diminuído o número de endósporos disponíveis. Esses resultados concordam com os obtidos por Spaul (1984), que depois de estudar as interações entre *M. incognita* e *Pasteuria* sp. em campos de cana-de-açúcar no Sul da África, concluiu que a bactéria foi incapaz de diminuir as densidades populacionais do nematóide. Os resultados aqui obtidos indicam que a bactéria e o nematóide não estão em equilíbrio nesta área. Por outro lado, Giblin-Davis, McDaniel e Bilz (1990) observaram que o número de *Belonolaimus longicaudatus* e a percentagem de infestação permaneceram constantes no solo por um período de 16 meses, indicando a ocorrência de equilíbrio entre os organismos. O número de endósporos/ J_2 manteve-se constante em todo o período estudado (Figura 3, E e F), confirmando observações feitas por Ciancio (1995) em uma associação entre *Pasteuria* spp e *Xiphinema diversicaudatum*, o que indica a ocorrência de equilíbrio entre esses organismos. Entretanto, neste estudo, o número médio de endósporos/ J_2 apresentou uma tendência de decréscimo quando ocorreu uma maior densidade populacional de J_2 no solo, o que reforça a hipótese de falta de equilíbrio entre os organismos nas microparcelas.

Nenhuma correlação entre o número de $J_2/100 \text{ cm}^3$ de solo, percentagem de infestação e número de endósporos/ J_2 foi encontrada, indicando independência entre os eventos. Resultados semelhantes foram encontrados por Ciancio, Mankau e Mundo-Ocampo (1992) em *Helicotylenchus lobus* naturalmente associado à *Pasteuria* sp. Quando as médias mensais de $J_2/100 \text{ cm}^3$ de solo, percentagem de parasitismo e número de endósporos/ J_2 foram correlacionadas com os dados climáticos (correlações de Pearson), obteve-se correlação positiva entre o número de $J_2/100 \text{ cm}^3$ de solo e a precipitação acumulada 5 dias antes da amostragem ($r = 0,6157$, $p = 0165$), indicando que a precipitação influenciou diretamente o número de J_2 de *Meloidogyne* presente no solo. Tal fato pode ter contribuído para a diminuição da eficiência de *Pasteuria* através do aumento da taxa reprodutiva do nematóide.

Nas microparcelsas estudadas, *Meloidogyne* spp. e *Pasteuria* não se encontravam em uma condição de equilíbrio, entretanto, é esperado que a densidade de endósporos no solo aumente com o passar do tempo, estabelecendo-se o equilíbrio. No Sul da Austrália, Stirling e White (1982) detectaram *Pasteuria* sp. mais facilmente em vinhedos com idade avançada do que nos novos, demonstrando a demora para que a bactéria atinja uma alta densidade populacional, capaz de controlar a densidade de *Meloidogyne* spp. Por outro lado, quando os endósporos são adicionados no solo em grandes quantidades, parece haver um aumento acelerado da densidade da bactéria no solo. Em microparcelsas infestadas experimentalmente com *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *Pasteuria* sp., Oostendorp, Dickson e Mitchell (1991) observaram um aumento significativo da densidade populacional da bactéria após 2 anos de plantio com culturas anuais.

A falta de equilíbrio entre a bactéria e *Meloidogyne* spp. pode também ser resultado do desenvolvimento de resistência por parte do nematóide hospedeiro ao ataque de *Pasteuria*, como demonstrado por Tzortzakakis e Gowen (1994). Além desses fatores, outros, muitas vezes de origem desconhecida, podem afetar as interações entre *Pasteuria* e o nematóide hospedeiro.

Das 100 fêmeas de *Meloidogyne* analisadas, 86% foram identificadas como *M. incognita* e 14% como *M. javanica*, sendo que 17,44% e 7,14% das fêmeas de *M. incognita* e *M. javanica* respectivamente estavam parasitadas por *Pasteuria* sp. Esta constatação parece ser um indicativo da preferência do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. por *M. incognita*. Nas raízes foram encontradas em média $421,25 \pm 29,122$ fêmeas de *Meloidogyne* spp./g de raiz, sendo que $11,73 \pm 1,579$ % estavam parasitadas. A falta de correlação entre o número de fêmeas/g de raiz e a percentagem de parasitismo indica que esses eventos variam independentemente. Esses resultados divergem daqueles encontrados por Verdejo-Lucas (1992), uma vez que este autor encontrou correlação positiva entre o número de fêmeas/g de raiz e a percentagem de parasitismo. O número de endósporos produzido em cada fêmea variou de 1.310.000 a 3.495.000, com média $2.270.000 \pm 95.035,768$. Número de endósporos similar foi encontrado por Stirling (1981), em *M. javanica* desenvolvendo-se a temperatura de 25 °C. Segundo Davies, Kerry e Flynn (1988) o número de endósporos em cada fêmea é diretamente proporcional ao tamanho do corpo da fêmea. Em novembro/96, a percentagem média de J₂ infestados foi de $11,50 \pm 2,93\%$, enquanto a média de fêmeas parasitadas no mesmo mês foi de 16% no teste para a estimativa da proporção entre as espécies encontradas nas raízes e de $11,73 \pm 1,579$ para a estimativa do número delas/g de raiz. Observações semelhantes foram feitas por Verdejo-Lucas (1992) em pomares de kiwi, nos quais o autor encontrou uma percentagem média de infestação inferior para os J₂ no solo, quando comparado à percentagem de fêmeas parasitadas nas raízes.

As densidades populacionais de *P. brachyurus* no solo variaram de 0 a 56, com média de $7,13 \pm 0,74$ espécimens/100 cm³ de solo, sendo observados maiores índices em abril e julho (Figura 4 A). A partir de agosto a população aumentou consecutivamente. A percentagem de infestação e/ou parasitismo variou de 0 a 100, com média $10,38 \pm 1,57\%$, com decréscimo a partir de dezembro (Figura 4 B). Encontrou-se correlação positiva ($r = 0,6978$, $p = 0,0058$) entre a percentagem de *P. brachyurus* infestados e/ou parasitados e a temperatura média dos 5 dias anteriores às datas de amostragem,

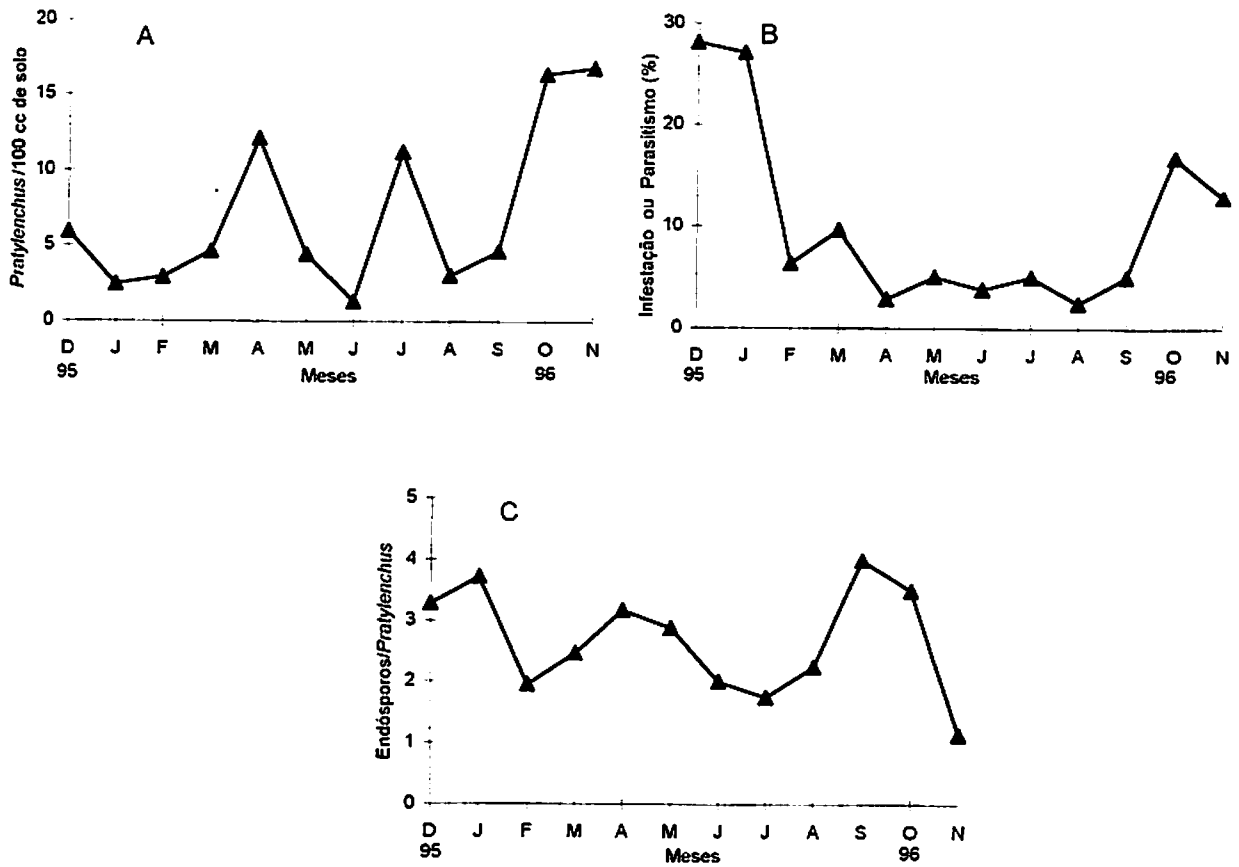


FIGURA 4. Associação de *Pasteuria* sp. e *Pratylenchus brachyurus*. (A) Número médio de *P. brachyurus*/100 cm³ de solo, (B) Percentagem média de infestação e/ou parasitismo, (C) Número médio de endósporos de *Pasteuria* sp./espécimen. UFLA, Lavras - MG, 1997.

indicando que em temperaturas maiores o nematóide se movimentou mais no solo, resultando em uma maior percentagem de infestação e/ou parasitismo. O número médio de endósporos/espécimen variou de 1 a 10,5, com média $2,76 \pm 0,27$. As pequenas variações observadas no número de endósporos/espécimen (Figura 4 C) são semelhantes às observações de Ciancio (1995) em um pomar naturalmente infestado por *Xiphinema diversicaudatum* e *Pasteuria* sp.

As densidades populacionais de *Aphelenchus* sp. no solo variaram de 0 a 88, com média de $8,73 \pm 0,79$ e picos populacionais em abril e julho, ocorrendo um aumento consecutivo a partir de agosto (Figura 5 A), à semelhança do comportamento de

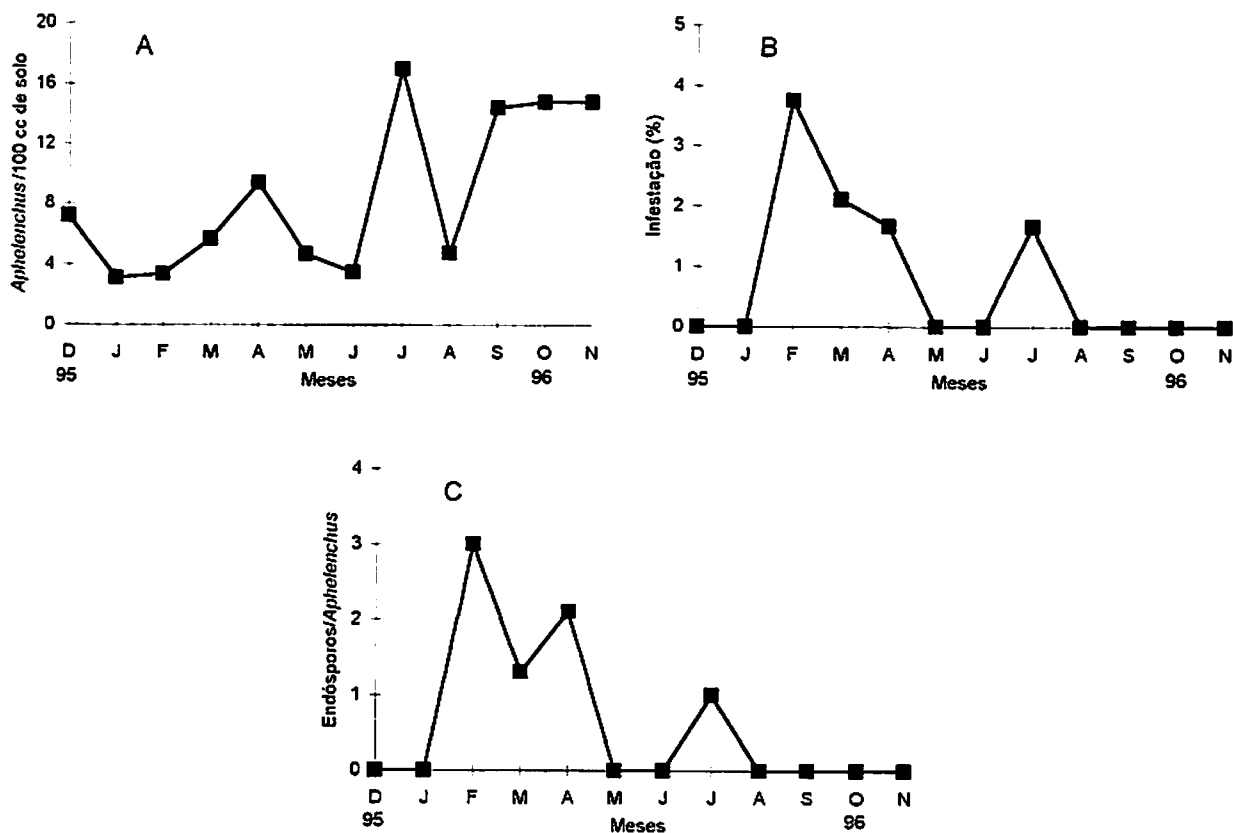


FIGURA 5. Associação de *Pasteuria* sp. com *Aphelenchus* sp. (A) Número médio de *Aphelenchus* sp./100 cm³ de solo, (B) Percentagem de infestação, (C) Número médio de endósporos de *Pasteuria* sp./espécimen. UFLA, Lavras - MG, 1997.

densidade populacional observado para *P. brachyurus* (Figura 4 A). *Aphelenchus* sp. foi encontrado infestado com endósporos de *Pasteuria* sp. em apenas 4 meses do estudo (Figura 5 B e C), sendo que a percentagem de infestação variou de 0 a 50, com média de $0,81 \pm 0,34$ e o número médio de endósporos/espécimen variou de 1 a 8, com média $3,67 \pm 1,02$. O número de *Aphelenchus*/100 cm³ de solo, percentagem média de infestação e número médio de endósporos/espécimen apresentaram um comportamento independente dos fatores climáticos. Os baixos índices de infestação e número de endósporos/espécimen observados, além da não observação de espécimens parasitados pela bactéria não permitiram concluir com certeza sobre a hospedabilidade

deste nematóide ao patótipo parasita de *Meloidogyne* spp., de *P. brachyurus* ou ainda se o mesmo constitui um patótipo específico para *Aphelenchus* sp. Outra possibilidade é a condição de não hospedeiro, uma vez que a observação de endósporos na cutícula não está correlacionada com o parasitismo (Stirling, 1984).

Aphelenchoides Fisher, *Criconema* Hofmaner e Menzel, *Criconemella* De Grisse e Loof, *Helicotylenchus dihystra* (Cobb) Sher, *Helicotylenchus* Steiner, *Tylenchus* Bastian e *Xiphinema* Cobb também ocorreram nas microparcelas, porém não apresentaram-se associados com *Pasteuria* spp.

4.3.2 *Heliconia* sp. infestada por *Meloidogyne* sp. associado a *Pasteuria* sp.

Pasteuria sp. foi observada infestando J₂ de *Meloidogyne* sp., não sendo examinadas as fêmeas nas raízes devido ao seu baixo número.

As densidades de J₂ de *Meloidogyne* sp. variaram de 0 a 68, com média $18,5 \pm 6,08$. Picos populacionais foram observados em janeiro, fevereiro, abril e setembro (Figura 6 A). No inverno, observaram-se as menores densidades de J₂ de *Meloidogyne* sp., provavelmente devido ao baixo nível de umidade do solo, o que dificultou a eclosão dos J₂. A percentagem de infestação dos J₂ variou de 0 a 50%, com média $11,85 \pm 5,96$ e o número médio de endósporos/J₂ de 1,5 a 8, média de $4,17 \pm 1,96$. Nesta área, foram observados J₂ infestados com endósporos em apenas 4 meses do estudo (Figura 6 B e C). A percentagem de infestação correlacionou-se positivamente com a precipitação acumulada 5 dias antes da amostragem ($r = 0,5175$, $p = 0,0424$), indicando que a presença da umidade foi essencial para a infestação. A umidade favoreceu a eclosão e movimentação dos J₂ e conseqüente infestação por *Pasteuria*. A distância de movimentação dos J₂ no solo e a concentração de endósporos no solo estão diretamente

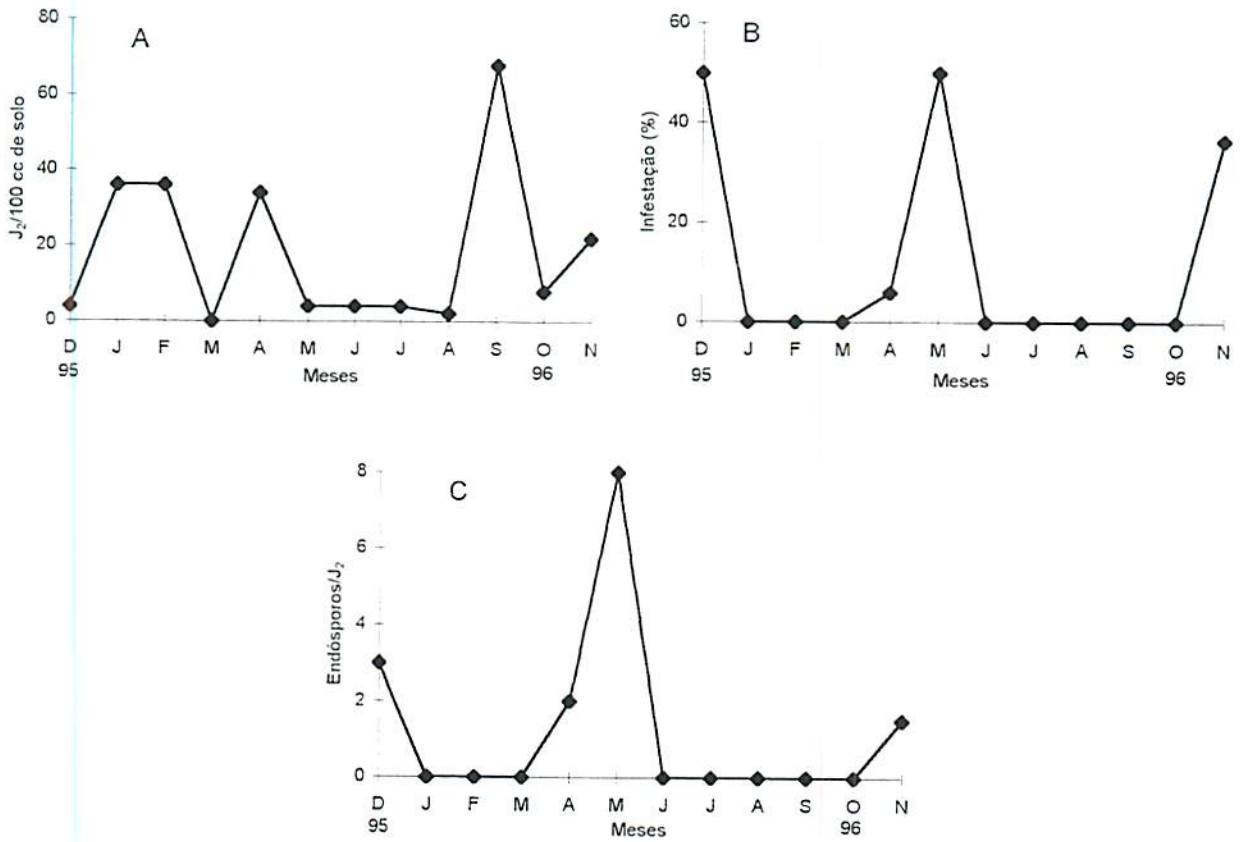


FIGURA 6. Associação de *J2* de *Meloidogyne* sp. e *Pasteuria* sp. (A) Densidade populacional de *Meloidogyne* sp./100 cm³ de solo, (B) Percentagem média de infestação, (C) Número médio de endósporos de *Pasteuria* sp./*J2*. UFLA, Lavras - MG, 1997.

correlacionados com a percentagem de infestação (Stirling, Sharma e Perry, 1990). Os baixos índices de infestação e número de endósporos/*J2* observados indicam baixa concentração de endósporos neste local.

Aphelenchus sp., *Aphelenchoides* sp., *Criconema* sp., *Ogma* (Chitwood) Andrassy, *Trichodorus* Cobb e *Tylenchus* sp. ocorreram no solo, porém sem nenhuma associação com a bactéria.

4.3.3 Citros infestado por *Tylenchulus semipenetrans* associado a *Pasteuria* sp.

O isolado de *Pasteuria* sp. foi observado infestando e parasitando naturalmente J₂ e machos de *T. semipenetrans*. De acordo com Fattah, Saleh e Aboud (1989) e Ciancio e Rocuzzo (1992) o isolado de *Pasteuria* sp. capaz de parasitar *T. semipenetrans* completa o ciclo de vida apenas em J₂ e machos.

A análise estatística não mostrou diferenças entre os meses no que se refere ao número de J₂/100 cm³ de solo, à percentagem de infestação e/ou parasitismo e ao número médio de endósporos/J₂. Entretanto, as densidades de J₂ de *T. semipenetrans*/100 cm³ de solo variaram de 18 a 316, com média de 152,5 ± 18,87. As densidades de J₂ no solo foram maiores no inverno do que nas outras épocas do ano (Figura 7 A). No inverno (abril, maio, junho e julho), os J₂ foram detectados em maior número no solo devido à paralisação do crescimento das raízes, o que impediu sua penetração. Resultados semelhantes foram encontrados por Verdejo-Lucas (1992) em um pomar de kiwi infestado por *Meloidogyne* spp. e *Pasteuria* sp. A percentagem de infestação e/ou parasitismo em J₂ variou de 5,26 a 63,64, média de 22,73 ± 3,13%, apresentando picos em janeiro e abril e decréscimo a partir deste mês (Figura 7 B). O número de endósporos/J₂ variou de 1 a 5,62, média de 2,94 ± 0,29, com picos durante alguns meses do inverno (abril, maio e junho) (Figura 7 C). O maior número de endósporos/J₂ em meses do inverno pode ser devido ao maior tempo de movimentação dos J₂ no solo, uma vez que raízes novas não estavam disponíveis para a penetração. Obteve-se correlação negativa entre o número de J₂/100 cm³ de solo e a percentagem de infestação e/ou parasitismo em J₂ ($r = -0,7873$, $p = 0,0014$), indicando que a quantidade de endósporos no solo ainda não atingiu um nível em que a bactéria seja capaz de suprimir o nematóide hospedeiro, ou seja, quando a densidade de J₂ no solo aumenta, a percentagem de infestação e/ou parasitismo decresce em função do pequeno número de endósporos de *Pasteuria* sp. presentes no solo. Na Itália, Ciancio (1995) também observou correlação inversa entre a densidade de *Xiphinema diversicaudatum* e a

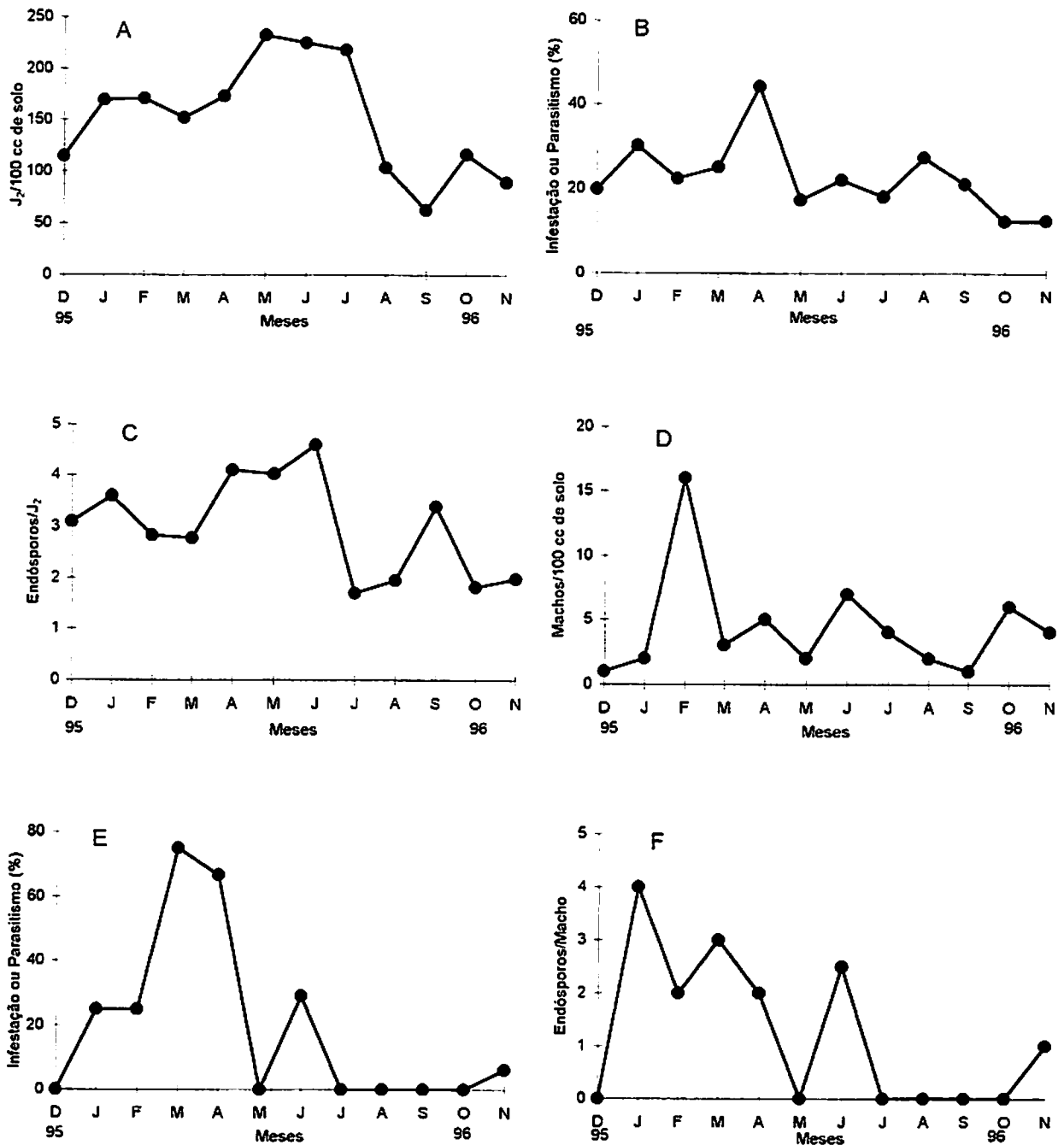


FIGURA 7. Associação de *Pasteuria* sp. e *T. semipenetrans*. (A) Densidade de J₂ de *T. semipenetrans*/100 cm³ de solo, (B) Percentagem média de infestação e/ou parasitismo em J₂, (C) Número médio de endósporos/J₂, (D) Número médio de machos adultos de *T. semipenetrans*/100 cm³ de solo, (E) Percentagem média de infestação e/ou parasitismo em machos, (F) Número médio de endósporos/macho. UFLA, Lavras - MG, 1997.

percentagem de parasitismo em um pomar de pêsego. Em culturas perenes, que são ecossistemas estáveis, o aumento da concentração de endósporos no solo pode demorar muitos anos (Stirling e White, 1982), além disso, a quantidade de endósporos produzidos por *Pasteuria* sp. em J₂ e machos de *T. semipenetrans* é pequena, devido à limitada fonte de alimento para a bactéria. O número de endósporos produzidos em nematóides volumosos pode ser 4000 vezes maior que os produzidos em nematóides filiformes (Sturham et al., 1994).

O número de machos adultos/100 cm³ de solo variou de 0 a 24, média de $4,41 \pm 1,01$, com um pico populacional em fevereiro e decréscimo a partir deste mês (Figura 7 D). A percentagem de infestação e/ou parasitismo em machos variou de 0 a 100, com média $18,62 \pm 6,12$ e maiores índices em março e abril, decrescendo a partir deste mês (Figura 7 E). O número de endósporos/macho variou de 1 a 4, com média $2,4 \pm 0,26$, apresentando maiores índices em janeiro, março e junho, decrescendo a partir de junho e com tendências de crescimento a partir de outubro (Figura 7 F). O número de machos recuperados do solo foi muito baixo durante o estudo e a percentagem de infestação e/ou parasitismo em machos foi semelhante àquela observada para J₂. Uma das razões para a recuperação desse baixo número de machos pode ser devido à coleta dos J₂ do solo antes de sua transformação em machos, uma vez que aproximadamente 25% do número total de J₂ convertem-se em machos (Van Gundy, 1958). O número de machos/100 cm³ de solo, percentagem de infestação e/ou parasitismo e o número de endósporos variaram independentemente, não apresentando nenhuma relação com os fatores climáticos.

Aphelenchus sp., *Helicotylenchus* sp. e *Tylenchus* sp. ocorreram no local, entretanto, sem associação com *Pasteuria* spp.

Foi grande a diversidade morfométrica dos endósporos nos hospedeiros estudados (Tabela 1). Esses resultados assemelham-se aos obtidos por Spaul (1981), Sayre et al. (1988) e Ciancio et al. (1994). A diversidade morfométrica, juntamente com a gama de hospedeiros foi anteriormente utilizada para a descrição das três espécies de

Pasteuria parasitas de nematóides (Sayre e Starr, 1985; Starr e Sayre, 1988; Sayre et al., 1991). Populações de *Pasteuria* spp. com diferentes formas morfométricas estão associadas a um grande número de hospedeiros (Ciancio et al., 1994), entretanto, ainda hoje, a importância das características morfométricas na taxonomia da bactéria não é bem entendida. Essa diversidade morfométrica parece ser resultante da co-evolução dos organismos na natureza (Ciancio et al., 1994).

TABELA 1. Diâmetro, altura e razão entre ambos, dos endósporos de *Pasteuria* spp. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Espécie	Diâmetro (μm)	Altura (μm)	Razão *
<i>Meloidogyne</i> spp.	$4,1 \pm 0,006$ **	$1,68 \pm 0,003$	2,44
<i>Pratylenchus brachyurus</i>	$3,28 \pm 0,002$	$1,17 \pm 0,002$	2,8
<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	$3,63 \pm 0,004$	$1,1 \pm 0,002$	3,3

* Relação entre o diâmetro e a altura

** Média de 20 repetições, com o erro padrão

Portanto, apesar de ser clara a diversidade morfométrica em diferentes hospedeiros (Tabela 1) não é prudente considerar cada um deles como uma nova espécie de *Pasteuria*, uma vez que a mesma é constituída de inúmeros tipos patológicos, morfométricos e biológicos (Sayre e Starr, 1988; Ciancio et al., 1994). Por isso, enquanto a taxonomia da bactéria permanecer indefinida, Sayre e Starr (1988) e Sayre et al. (1991) recomendam que o nome *Pasteuria penetrans* (e sinônimas anteriores: "*Duboscqia penetrans*, *Bacillus penetrans*") encontradas na literatura sejam chamados de "*Pasteuria* spp." ou "membros do grupo *Pasteuria penetrans*".

4.4 CONCLUSÕES

Observaram-se grandes variações nas flutuações populacionais dos nematóides associados com *Pasteuria* spp. nas três áreas estudadas.

A bactéria e os nematóides hospedeiros pareceram não se encontrar em uma condição de equilíbrio nos locais estudados.

Observaram-se grandes variações na morfometria dos endósporos de *Pasteuria* spp. encontrados nos diferentes hospedeiros.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, V.P. Processo rápido para preparo de nematóides para exame. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17, Jaboticabal, 1993. Resumos ..., Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1993. p.82.
- CIANCIO, A. Density-dependent parasitism of *Xiphinema diversicaudatum* by *Pasteuria penetrans* in a naturally infested field. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.2, p.144-149, Feb. 1995.
- CIANCIO, A.; BONSIGNORE, R.; VOVLAS, N.; LAMBERTI, F. Host records and morphometrics of *Pasteuria penetrans* group parasites of nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.63, n.3, p.260-267, May 1994.
- CIANCIO, A.; MANKAU, R.; MUNDO-OCAMPO, M. Parasitism of *Helicotylenchus lobus* by *Pasteuria penetrans* in naturally infested soil. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.1, p.29-35, Mar. 1992.
- CIANCIO, A.; ROCCUZZO, G. Observations on a *Pasteuria* sp. parasitic in *Tylenchulus semipenetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.38, n.4, p.403, Sept. 1992. (Resumos)
- DAVIES, K.G.; FLYNN, C.A.; LAIRD, V.E.; KERRY, B.R. The life-cycle, population dynamics and host specificity of a parasite of *Heterodera avenae*, similar to *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v.13, n.3, p. 303-309, juil. 1990.
- DAVIES, K.G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v.112, n.3, p.491-501, June 1988.

- FATTAH, F.A.; SALEH, H.M.; ABOUD, H.M. Parasitism of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by *Pasteuria penetrans* in Iraq. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.21, n.3, p.431-433, July 1989.
- GIBLIN-DAVIS, R.M.; McDANIEL, L.L.; BILZ, F.G. Isolates of the *Pasteuria penetrans* group from phytoparasitic nematodes in bermudagrass turf. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.22, n.4S, p.750-762, Oct. 1990.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, n.9, p.692, Sept. 1964.
- MANKAU, R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing virulent disease of plant-parasitic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.26, n.3, p.333-339, Nov. 1975.
- NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. Diagnostics and remedial measures I. In: _____. **Applied Linear Statistical Models**. Burr Ridge: R.R. Donnelley & Sons Company, 1990. p.113-158.
- NISHIZAWA, T. On strain of *Pasteuria penetrans* parasitic to cyst nematodes. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v.9, n.3, p.303-304, nov. 1992. (Resumos)
- NISHIZAWA, T. A decline phenomenon in a population of upland rice cyst nematode, *Heterodera elachista*, caused by bacterial parasite, *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.17, n.4, p.546, Oct. 1987. (Resumos)
- OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.23, n.1, p.58-64, Jan. 1991.
- SAYRE, R.M.; STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. **Proceedings of Helminthological Society of Washington**, Washington, v.52, n.2, p.149-165, Jan. 1985.
- SAYRE, R.M.; STARR, M.P. Bacterial diseases and antagonisms of nematodes. In: POINAR Jr, G.; JANSSON, H.B. **Diseases of Nematodes**. Boca Raton: 1988. vol. 1, cap. 5, p.69-101.

- SAYRE, R.M.; STARR, M.P.; GOLDEN, A.; WERGIN, W.P.; ENDO, B.Y. Comparison of *Pasteuria penetrans* from *Meloidogyne incognita* with a related mycelial and endospore-forming bacterial parasite from *Pratylenchus brachyurus*. *Proceedings of Helminthological Society of Washington*, Washington, v.55, n.1, p.28-49, July 1988.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P.; SCHMIDT, J.M.; STARR, M.P. *Pasteuria nishizawae* sp. nov., a micelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. *Research in Microbiology*, Paris, v.142, p.551-564, 1991.
- SPAULL, V.W. *Bacillus penetrans* in South African plant-parasitic nematodes. *Nematologica*, Leiden, v.27, n.2, p.244-245, Mar. 1981.
- SPAULL, V.W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. *Revue de Nématologie*, Montrouge Cedex, v.7, n.3, p.277-282, avr. 1984.
- STARR, M.P.; SAYRE, R.M. *Pasteuria thornei* sp. nov and *Pasteuria penetrans sensu stricto* emend., mycelial and endospore forming bacteria parasitic, respectively, on plant parasitic nematodes of genera *Pratylenchus* and *Meloidogyne*. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, Paris, v.139, n.1, p.11-31, 1988.
- STIRLING, G.R. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Nematologica*, Leiden, v.27, n.4, p.458-462, Dec. 1981.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, St. Paul, v.74, n.1, p.55-60, Jan. 1984.
- STIRLING, G.R. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. *Nematologica*, Leiden, v.31, n.2, p.203-209, Apr. 1985.
- STIRLING, G.R.; SHARMA, R.D.; PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. *Nematologica*, Leiden, v.36, n.2, p.246-252, Apr. 1990.
- STIRLING, G.R., WHITE, A.M. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australia vineyards. *Plant Disease*, St. Paul, v.66, n.1, p.52-53, Jan. 1982.

- STURHAM, D.; WINKELHEIDE, R.; SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Light and electron microscopical studies of the life cycle and developmental stages of *Pasteuria* isolate parasitizing the pea cyst nematode, *Heterodera goettingiana*. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge Cedex, v.17, n.1, p.29-42, jan. 1994.
- TAYLOR, A.L.; J.N. SASSER. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: North Caroline State Un. Graphics, 1978. 111p.
- TZORTZAKAKIS, E.A.; GOWEN, S.R. Resistance of *Meloidogyne* spp. to parasitism by the obligate parasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.40, n.2, p.258-266, Apr. 1994.
- VAN GUNDY, S.D. The life history of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.3, n.4, 282-294, Nov. 1958.
- VERDEJO-LUCAS, S. Seasonal population fluctuations of *Meloidogyne* spp. and the *Pasteuria penetrans* group in kiwi orchards. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, n.12, p.1275-1279, Dec. 1992.

5 CAPÍTULO II

ADESÃO DE ENDÓSPOROS DO ISOLADO P1-UFLA DE *PASTEURIA* SP. EM FITONEMATÓIDES

RESUMO

SOUZA, Jorge Teodoro de. Adesão de endósporos do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. em fitonematóides. In: ____ **Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides.** Lavras: UFLA, 1997. Cap. 2, p. 60-78. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

O isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. apresentou especificidade em relação aos hospedeiros testados. Apenas *M. javanica* População 1 (P1), P2, P3, P4 e P5), *M. incognita* (raças 1, 2, 4 e P2) e uma população mista de *M. javanica* e *M. incognita* foram considerados hospedeiros, baseado na adesão de endósporos na cutícula e no parasitismo em fêmeas. A adesão de endósporos não ocorreu em machos e fêmeas de *M. incognita* raça 2, apesar de ter ocorrido em J₂ desse nematóide. O isolado P1-UFLA apresentou-se mais agressivo à *M. javanica* (P3 e P4) e *M. incognita* (raças 1, 2 e 4), com maiores percentagens de infestação e parasitismo do que nas demais populações testadas. A população mista de *M. javanica* e *M. incognita*, na qual o isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. foi originalmente encontrado, apresentou resistência parcial ao ataque desse isolado. A mobilidade dos J₂ de *M. javanica* e *M. incognita* não foi afetada pela centrifugação e pela presença de endósporos na cutícula. O número de endósporos aderidos à cutícula dos J₂ de *M. javanica* não foi afetado pela idade dos nematóides. Os J₂ de *M. javanica* e *M. incognita* raça 1 mortos pelo calor apresentaram menor número ($p < 0,01$) de endósporos aderidos à cutícula quando comparados aos J₂ vivos.

ABSTRACT

Endospore attachment of P1-UFLA isolate of *Pasteuria* sp. on phytonematodes

The P1-UFLA isolate of *Pasteuria* sp. showed host specificity. Only *M. javanica* Populations (P1, P2, P3, P4 and P5), *M. incognita* (races 1, 2, 4 and P2) and a mixed population of *M. javanica* and *M. incognita* were considered hosts based on the endospore attachment and female parasitism. The endospore attachment did not occur in males and females of *M. incognita* race 2, but occurred in J₂ of this nematode. The P1-UFLA isolate of *Pasteuria* sp. was more aggressive to *M. javanica* (P3 e P4) and *M. incognita* (raças 1, 2 e 4), with higher percentages of infestation and parasitism than in others tested populations. The mixed population of *M. incognita* and *M. javanica* from which the isolate P1-UFLA of *Pasteuria* sp. was found, showed partial resistance to infestation and parasitism by P1-UFLA isolate. The mobility of *M. javanica* and *M. incognita* J₂ was not affected by the centrifugation and by the presence of endospores on the cuticle. The number of endospores attached to the cuticle of *M. javanica* J₂ was not affected by the age of J₂. Killing *M. javanica* and *M. incognita* race 1 J₂ by heat treatment resulted in lower number ($p < 0.01$) of endospores attached to the cuticle than on the cuticle of living J₂.

5.1 INTRODUÇÃO

A adesão de endósporos de *Pasteuria* spp. na cutícula do nematóide desencadeia o processo de parasitismo, e estabelece o início do ciclo de vida dessa bactéria no hospedeiro. Entretanto, Stirling (1985) demonstrou que a adesão de endósporos na cutícula nem sempre está relacionada ao processo parasitário, mas para a associação de ambos num processo parasitário, a adesão é o início de tudo. Por isso o teste de adesão constitui de relevância na determinação da gama de hospedeiros de um isolado de *Pasteuria*. Vários autores estudaram a adesão de endósporos de *Pasteuria* em juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne* spp. (Mankau e Prasad, 1977; Dutky e Sayre, 1978; Stirling, 1985), demonstrando que populações individuais da bactéria apresentam uma limitada gama de hospedeiros. Em estudos realizados por Davies, Kerry e Flynn (1988) endósporos de populações individuais de *Pasteuria* sp., parasitas de *Meloidogyne* spp., aderiram-se mais facilmente aos J₂ das populações de *Meloidogyne* spp. das quais os isolados ou populações da bactéria foram originalmente obtidos. As variações na adesão de endósporos à cutícula de J₂ têm sido atribuídas à diferenças na composição da cutícula de diferentes espécies, raças e populações de *Meloidogyne* spp. (Davies e Danks, 1992) e entre as diferentes espécies de outros gêneros. A heterogeneidade da superfície dos endósporos é também um fator de grande influência nas adesões diferenciadas (Davies, Robinson e Laird, 1992; Davies, Redden e Pearson, 1994).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar a hospedabilidade de vários nematóides ao isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp., estudar sua agressividade à populações de *Meloidogyne* spp., verificar a influência desse isolado sobre a mobilidade de J₂, bem como sua adesão em J₂ vivos e mortos pelo calor e em J₂ de diferentes idades.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os endósporos de *Pasteuria* sp., isolado P1-UFLA, foram obtidos de raízes frescas de tomateiro, coletadas de microparcels naturalmente infestadas com *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* associadas com *Pasteuria* sp. No laboratório, essas raízes foram cortadas em pedaços de 2 cm, deixadas embebidas por 3 dias em solução de citolase 50% (Genencor International, Rochester, NY) a 4 °C. A seguir, foram colocadas em copos de agitador para solo e agitadas por 10 minutos. O material obtido foi passado por peneiras de 20 e 150 malhas. Coletaram-se, do material retido na peneira de 150 malhas, fêmeas parasitadas, que foram trituradas em triturador de tecidos (Pyrex 7727-15), para a obtenção da suspensão, com concentração determinada em câmara de Neubauer como sendo $3,8 \times 10^6$ endósporos/ml. Decidiu-se estudar a gama de hospedeiros de *Pasteuria* sp., isolado P1-UFLA, através do teste de adesão de endósporos na cutícula e da multiplicação da bactéria no interior do nematóide hospedeiro. Os nematóides selecionados para o teste foram: populações puras de *Meloidogyne incognita* (raças 1, 2, 3 e 4), *M. incognita* (2 populações - P1 e P2), *M. javanica* (5 populações - P1, P2, P3, P4 e P5), *M. paranaensis* e *Heterodera glycines*, originados de diversas localidades (Tabela 2). Todos os nematóides foram mantidos em vasos de cerâmica com capacidade para 15 litros com substrato 3:2:1 (areia, solo, esterco), em casa de vegetação por 4 meses. Para a multiplicação de *Meloidogyne incognita* (raças 1, 2, 3 e 4), *M. incognita* P2, *M. javanica* (P1, P2, P3, P4 e P5) e *M. paranaensis* empregaram-se tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill var. Rey de Los Tempranos), para *M. incognita*

P1, pimentão (*Capsicum annuum* L.) e para *Heterodera glycines* soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Cristalina). Entretanto, inóculo de uma população mista (*M. incognita* + *M. javanica*) foi obtido de raízes de tomateiro já em crescimento, coletadas das microparcelas, de onde obteve-se o inóculo de *Pasteuria* sp. *Meloidogyne exigua* foi obtida de raízes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) infestados, cultivados no Departamento de Agricultura (DAG) da UFLA; *M. hapla* de raízes de poejo (*Mentha* sp.) cultivado no Horto de Plantas Medicinais da UFLA; juvenis do segundo estágio (J₂) de *Tylenchulus semipenetrans* de solo coletado na rizosfera de citros (*Citrus* sp.) cultivado no município de Perdões, MG; populações de *Aphelenchus* sp.; *Aphelenchoides* sp.; *Helicotylenchus dihystera* e *Pratylenchus brachyurus* de solo coletado nas microparcelas delimitadas por fibra de vidro e *Panagrellus redivivus* de culturas mantidas no Laboratório de Nematologia da UFLA. Para a obtenção dos ovos de *Meloidogyne* spp., as raízes, imersas em uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% foram trituradas em liquidificador (45 segundos) e posteriormente passadas em peneiras de 200 e 400 malhas respectivamente, sendo os ovos coletados na última. Os J₂ foram obtidos destes ovos, através da incubação em funil de Baerman a temperatura ambiente (± 26 °C). Foram usados apenas J₂ com no máximo 24 horas de idade. Do solo, foram os nematóides extraídos pela técnica de Jenkins (1964). Para a adesão de endósporos na cutícula dos nematóides, utilizou-se o método de centrifugação (Hewlett e Dickson, 1993) com modificações. Em tubos de centrífuga do tipo eppendorf, com capacidade para 1,5 ml, previamente lavados com leite desnatado e enxaguados com água destilada (pág 38 do capítulo I), adicionaram-se 300 μ l de água destilada contendo 100 J₂ de cada população teste de *Meloidogyne*, 10 machos ou 10 fêmeas de *M. incognita* raça 2, ou 30 espécimens das demais espécies anteriormente citadas em cada tubo, juntamente com 50 μ l da suspensão com concentração $3,8 \times 10^6$ endósporos/ml, em quatro repetições. Após a centrifugação em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5402 a 800 g por 3 minutos a 30 °C, transferiu-se o conteúdo dos tubos para vidros de relógio. Sob microscópio ótico de objetivas invertidas a 250X, determinou-se o número de nematóides infestados por *Pasteuria* sp. e o número de endósporos/espécimen, contidos em cada tubo. Os

nematóides com endósporos aderidos na cutícula foram considerados infestados. O ensaio foi montado em DIC (delineamento inteiramente casualizado), com 25 tratamentos (populações testadas) e 4 repetições. Em tomateiros com 4 semanas de idade (a partir da semeadura) plantados em copos plásticos contendo 100 g de areia lavada e irrigados diariamente com solução nutritiva de Johanson et al. (1957) citada por Epstein (1975) inocularam-se os J₂ de 10 populações de *M. javanica* e *M. incognita* com endósporos aderidos à cutícula. Após 35 dias da inoculação, as raízes foram colhidas, sendo as fêmeas coletadas e feita a estimativa de parasitismo como descrito na pág. 38 do capítulo I, obtendo-se dessa forma o número total de fêmeas e a percentagem delas parasitadas por *Pasteuria* sp. em cada sistema radicular. Apenas 10 tratamentos foram submetidos a análise de variância, não tendo sido os outros por possuírem média de infestação zero ou por não terem sido testados quanto ao parasitismo. Aplicou-se o teste Scott-Knot para a separação das médias. As análises foram processadas no sistema SAEG 5.0 (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas).

No estudo da mobilidade de J₂ infestados por *Pasteuria* sp., empregaram-se uma população P4 de *M. javanica* e raça 1 de *M. incognita*, devido à grande suscetibilidade à bactéria demonstrada no ensaio anterior sobre a gama de hospedeiros. A multiplicação dos nematóides e a extração dos ovos foram feitas como descrito anteriormente. Para a obtenção dos J₂, os ovos foram incubados sobre folhas de papel toalha tendo como suporte telas de plástico de 20 malhas colocadas em recipientes de 500 ml contendo água e oxigênio fornecido por borbulhamento constante. Foram usados apenas J₂ com no máximo 24 horas de idade. Neste estudo utilizou-se uma suspensão de endósporos de *Pasteuria* sp. com concentração 6×10^6 endósporos/ml, preparada conforme descrito anteriormente. Empregou-se o método de Moje (1959) citado por Huang et al. (1983), no qual os J₂ infestados com endósporos juntamente com 10 ml de água foram colocados em vidros com capacidade para 15 ml, vedados com folhas de papel toalha e invertidos sobre placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 40 ml de água. Os ensaios com as duas espécies foram montados separadamente em DBC (delineamento em blocos casualizados) com quatro tratamentos (concentrações de endósporos e centrifugações) e

cinco repetições. Os tratamentos constituíram-se de J_2 não centrifugados e centrifugados para a obtenção de 0, 1-10 e 11-30 endósporos/ J_2 , para cada uma das espécies. Para a obtenção dos J_2 infestados procedeu-se como descrito anteriormente. Para a obtenção de 1-10 endósporos/ J_2 foram adicionados 10 μ l da suspensão de concentração 6×10^6 endósporos/ml em tubos contendo *M. incognita* e 15 μ l em tubos contendo *M. javanica*, enquanto que para a obtenção de 11-30 endósporos/ J_2 , adicionaram-se 80 μ l em tubos contendo *M. incognita* e 90 μ l em tubos contendo *M. javanica*. Após a centrifugação os J_2 foram transferidos para vidros de relógio como descrito anteriormente. Cinquenta J_2 de *M. incognita* raça 1 ou *M. javanica* P4 contendo 0 (centrifugados ou não), 1-10 e 11-30 endósporos foram selecionados e transferidos para cada vidro separadamente, em cinco repetições. Depois de 24 horas, foram contados sobre microscópio ótico a 250 X o número de J_2 que tinham migrado para as placas de Petri. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância no SAEG 5.0.

No estudo do efeito da idade dos J_2 sobre a adesão de endósporos do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp., foram empregados tubos tipo eppendorf contendo 200 μ l de água destilada e 100 J_2 de *M. javanica* (P4) obtidos como descrito anteriormente, mantidos em geladeira a 4 °C por até 28 dias. No primeiro dia e posteriormente a cada sete dias, cinco tubos contendo os J_2 receberam 40 μ l de suspensão com endósporos de *Pasteuria* sp. na concentração de 6×10^6 endósporos/ml e foram centrifugados como descrito anteriormente, até o 28^o dia. Após a centrifugação, os J_2 foram transferidos para vidros de relógio e sob microscópio ótico a 250X, estimou-se o número de endósporos/ J_2 em 20 J_2 de cada tubo. Os dados obtidos no 1^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias foram submetidos à análise de variância no Sistema SAEG 5.0.

Avaliaram-se através do método de centrifugação o número de endósporos aderidos em J_2 de *M. incognita* raça 1 e em *M. javanica* vivos ou mortos pelo calor. Para isso, tubos tipo eppendorf contendo 200 μ l de água destilada e 100 J_2 de *M. javanica* (P4) ou *M. incognita* raça 1 vivos ou mortos por prévia imersão em água a 60 °C por 5 minutos receberam 40 μ l de uma suspensão de 6×10^6 endósporos/ml, em 2 repetições e centrifugados conforme descrito anteriormente. Em seguida, os J_2 foram transferidos

para vidros de relógio e sob microscópio ótico de objetivas invertidas a 250X avaliou-se o número de endósporos/J₂ em 20 J₂ de cada um dos tubos. As médias do número de endósporos/J₂ vivos e mortos separados por espécie foram comparadas pelo teste de "t".

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Hospedeiros do Isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp.

isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. apresentou especificidade em relação aos hospedeiros testados. Dos nematóides testados (Tabela 2), apenas *M. javanica* População 1 (P1), P2, P3, P4 e P5), *M. incognita* (raças 1, 2, 4 e P2) e uma população mista de *M. javanica* e *M. incognita* puderam ser considerados como hospedeiros do isolado estudado. Apesar de ter ocorrido a adesão de endósporos na cutícula de *M. hapla* e em juvenis de *Aphelenchoides* sp., não foi testado o parasitismo nesses nematóides, o que impossibilitou, nesse estudo, a inclusão dos mesmos como hospedeiros do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. A adesão de endósporos é a primeira fase do processo infectivo de *Pasteuria* spp. em seus hospedeiros, sendo sua ocorrência uma condição essencial para o parasitismo, entretanto, uma determinada espécie de nematóide não pode ser considerada hospedeira de *Pasteuria* sp. apenas pela observação de endósporos aderidos em sua cutícula, pois o processo de infecção só tem início com a germinação do endósporo através da cutícula. Portanto, para que um determinado nematóide seja considerado hospedeiro, é necessária a observação de endósporos ou qualquer outra fase do ciclo de vida da bactéria no interior do corpo desse nematóide (Stirling, 1985; Davies, Kerry e Flynn, 1988). Foi também observada uma relativa preferência desse isolado da bactéria por algumas das populações testadas. O isolado P1-UFLA foi mais agressivo para *M. javanica* (P3 e P4) e *M. incognita* (raças 1, 2 e 4 e população P2),

TABELA 2. Percentagem de infestação e número de endósporos do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp./espécimen de diversas espécies ou populações de nematóides obtidos de diferentes localidades após centrifugação e percentagem de fêmeas de *Meloidogyne* spp. parasitadas (% de parasitismo) após 35 dias da inoculação em tomateiro. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Nematóide Testado	Origem	Endósporos/ Espécimen *	Infestação (%) *	Parasitismo (%) *
<i>Meloidogyne exigua</i>	Lavras/MG	0,00	0,00	-
<i>M. hapla</i>	Lavras/MG	3,00	38,30	-
Machos <i>M. incognita</i> raça 2	Londrina/PR	0,00	0,00	-
Fêmeas <i>M. incognita</i> raça 2	Londrina/PR	0,00	0,00	-
<i>M. incognita</i> População 1 (P1)	Lavras/MG	0,00	0,00	-
<i>M. incognita</i> raça 3	Londrina/MG	0,00	0,00	-
<i>M. incognita</i> + <i>M. javanica</i>	Lavras/MG	0,33 C **	15,00	09,84 C **
<i>M. incognita</i> P2	Ijaci/MG	7,95 A	100,00	90,29 A
<i>M. incognita</i> raça 1	Londrina/PR	10,15 A	100,00	94,55 A
<i>M. incognita</i> raça 2	Londrina/PR	08,35 A	100,00	88,21 A
<i>M. incognita</i> raça 4	Londrina/PR	10,05 A	100,00	98,69 A
<i>M. javanica</i> População (P1)	Ijaci/MG	6,25 A	95,00	84,67 B
<i>M. javanica</i> P2	Dourados/MS	5,85 B	100,00	76,40 B
<i>M. javanica</i> P3	Londrina/PR	6,65 A	95,00	89,05 A
<i>M. javanica</i> P4	Lavras/MG	8,60 A	100,00	93,15 A
<i>M. javanica</i> P5	Lavras/MG	1,65 C	20,00	16,35 C
<i>M. paranaensis</i>	Londrina/PR	0,00	0,00	-
<i>Heterodera glycines</i>	Iraí de Minas/MG	0,00	0,00	-
<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Perdões/MG	0,00	0,00	-
<i>Aphelenchus</i> sp.	Lavras/MG	0,00	0,00	-
Juvenis de <i>Aphelenchoides</i> sp.	Lavras/MG	4,30	40,00	-
Adultos de <i>Aphelenchoides</i> sp.	Lavras/MG	0,00	0,00	-
<i>Helicotylenchus dihystra</i>	Lavras/MG	0,00	0,00	-
<i>Pratylenchus brachyurus</i>	Lavras/MG	0,00	0,00	-
<i>Panagrellus redivivus</i>	Lavras/MG	0,00	0,00	-

* Média de 4 repetições

** Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5 %

levando-se em consideração as percentagens de infestação e parasitismo (Tabela 2). Diferenças na agressividade de populações de *Pasteuria* à *Meloidogyne* spp. foram observadas por Stirling (1985); Davies, Kerry e Flynn (1988) e Oostendorp, Dickson e Mitchell (1991). A agressividade diferenciada de *Pasteuria* spp. implica em efeitos diretos sobre o uso da bactéria como agente de controle biológico em condições de campo. Dessa forma, isolados com ampla gama de hospedeiros devem ser selecionados, buscando cobrir a diversidade natural dos fitonematóides. Durante a contagem dos endósporos sob microscópio, observou-se uma grande aglomeração dos J₂ com endósporos aderidos à cutícula, fato não ocorrido com os J₂ sem endósporos aderidos na cutícula. Comportamento semelhante foi observado em J₂ de outras espécies de *Meloidogyne* e *T. semipenetrans*, mas não por juvenis e adultos de *Pratylenchus scribneri* infestados pela bactéria (Mankau e Prasad, 1977; Fattah, Saleh e Aboud, 1989).

A adesão de endósporos não ocorreu na cutícula de fêmeas e machos de *M. incognita* raça 2, indicando que ocorrem mudanças nos sítios de reconhecimento entre a cutícula e os endósporos com as ecdises (Stirling, Bird e Cakurs, 1986).

Ocorreu especificidade ao nível de raça, uma vez que os endósporos do isolado estudado não se mostraram capazes de aderirem-se a cutícula de J₂ de *M. incognita* raça 3, mas aderindo-se à cutícula de J₂ das outras raças dessa espécie (Tabela 2). Apesar do isolado P1-UFLA ter sido encontrado parasitando a população mista de *M. incognita* e *M. javanica*, o número de endósporos/J₂ e as percentagens de infestação e parasitismo foram menores nessa população (Tabela 2), evidenciando a ocorrência de resistência dos nematóides ao ataque desse isolado da bactéria. A população mista testada constituiu-se de J₂ originados de ovos produzidos por fêmeas de *M. incognita* e *M. javanica* (maior proporção de *M. incognita* - pág. 46 do capítulo I), as quais escaparam da infecção de *Pasteuria* sp. A população mista ficou em contato com o isolado P1-UFLA por no mínimo 15 gerações do nematóide. Na Grécia, Tzortzakakis e Gowen (1994) relataram a ocorrência de resistência em uma população mista (*M. incognita* e *M. javanica*) ao ataque de um isolado de *Pasteuria* após quatro gerações dos nematóides em contato com a bactéria. A resistência foi quebrada quando os autores aplicaram uma

mistura de endósporos de vários isolados de *Pasteuria* sp. O mecanismo de resistência ao ataque da bactéria por parte do nematóide não é conhecido. É possível que os nematóides escapem do parasitismo através do desprendimento de endósporos da cutícula dos J₂ (Ratnasoma, Gowen e Hague, 1991) e pela não germinação dos endósporos (Tzortzakakis e Gowen, 1994). Sayre e Wergin (1977) e Stirling (1984) estimaram que apenas 20 a 30% dos endósporos aderidos à cutícula dos J₂ são capazes de germinar. Recentemente, Sturham et al. (1994), observaram que a maioria dos endósporos aderidos à cutícula dos J₂ de *Heterodera goettingiana* encontravam-se vazios, ou seja, não possuíam protoplasto, o que impossibilita sua germinação. Tal fato pode ocorrer com isolados da bactéria parasitas de *Meloidogyne* spp., diminuindo sua eficiência. É necessário que se selecione isolados de *Pasteuria* com ampla gama de hospedeiros para a aplicação em condições de campo como agentes de controle biológico.

5.3.2 Mobilidade de J₂ de *M. incognita* e *M. javanica* infestados por *Pasteuria* sp.

A mobilidade dos J₂ de *M. incognita* e *M. javanica* não foi afetada ($p \geq 0,05$) pela centrifugação ou presença de endósporos de *Pasteuria* aderidos à cutícula (Figura 8A e B). Entretanto, Davies, Laird e Kerry (1991) encontraram diferenças entre a mobilidade de J₂ de *M. incognita* com diferentes números de endósporos aderidos na cutícula, quando esta foi testada em tubos de areia. Neste estudo utilizou-se a água, que não mostrou ser uma barreira de grande dificuldade para a migração.

5.3.3 Efeito da Idade dos J₂ de *M. javanica* P4 sobre a Adesão de Endósporos

A idade dos J₂ de *M. javanica* P4 não afetou ($p \geq 0,05$) a adesão de endósporos de *Pasteuria* sp. (Figura 9), talvez, devido à força centrífuga empregada no ensaio, de maior

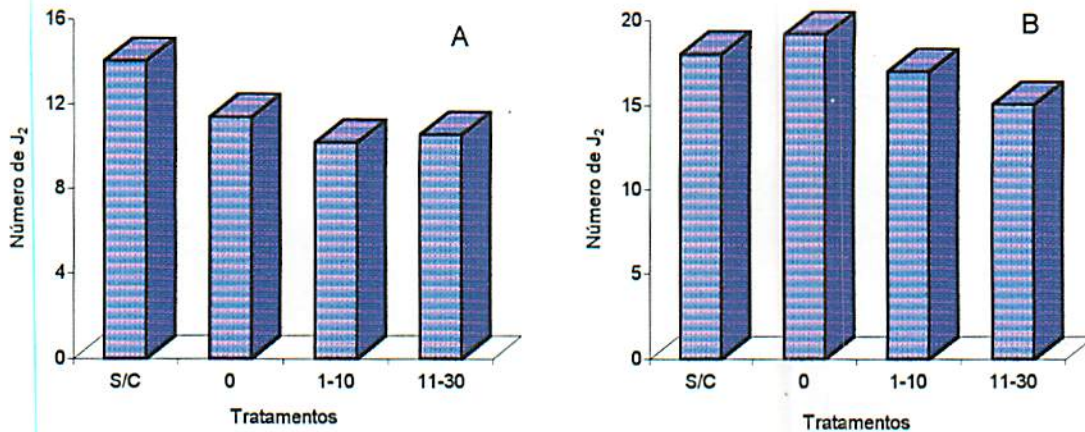


FIGURA 8. Mobilidade de J_2 de *Meloidogyne javanica* (A) e *Meloidogyne incognita* raça 1 (B), medida pelo número médio desses nematóides que atravessaram o papel toalha após a não centrifugação (S/C) e centrifugação, para a obtenção de 0 endósporos/ J_2 (0), 1-10 endósporos/ J_2 (1-10) e 11-30 endósporos/ J_2 (11-30). UFLA, Lavras - MG, 1997.

intensidade que em outros trabalhos. Davies, Laird e Kerry (1991), por exemplo, observaram que os J_2 obtidos de massas de ovos após 0-7; 8-14, 15-21 e 22-28 dias de incubação apresentaram taxas de infestação diferentes, tendo os J_2 mais jovens um maior número de endósporos aderidos na cutícula.

5.3.4 Adesão de Endósporos em J_2 *M. javanica* P4 e *M. incognita* raça 1

A morte, tanto dos J_2 de *M. javanica* como de *M. incognita*, reduz drasticamente ($p < 0,01$) a adesão de endósporos à cutícula (Figura 10). Provavelmente o aquecimento dos J_2 tenha alterado a composição da cutícula, afetando o processo de adesão. Stirling, Bird e Cakurs (1986) também observaram um maior número de endósporos aderidos em J_2 de *Meloidogyne* vivos que nos J_2 mortos pelo calor, entretanto não significativo estatisticamente.

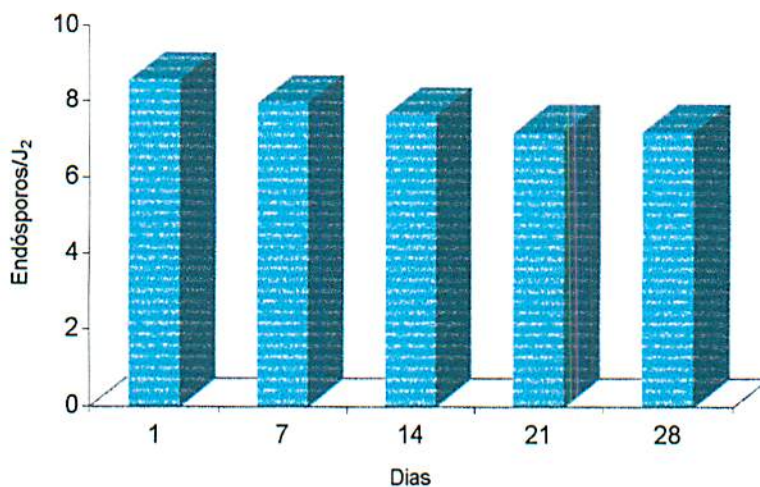


FIGURA 9. Número médio de endósporos de *Pasteuria sp./J₂* de *Meloidogyne javanica* P4 com diferentes idades. UFLA, Lavras - MG, 1997.

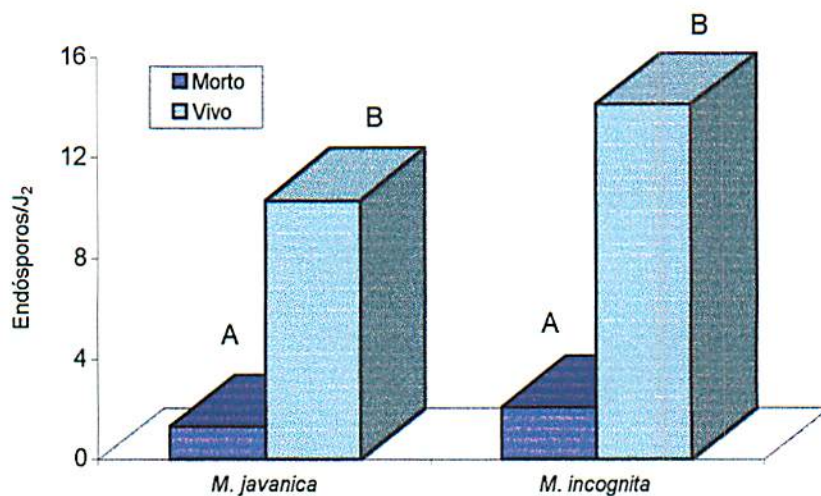


FIGURA 10. Número médio de endósporos de *Pasteuria sp./J₂* de *M. javanica* P4 e *M. incognita* raça 1 vivos ou mortos por tratamento térmico. UFLA, Lavras - MG, 1997.

5.4 CONCLUSÕES

Observou-se especificidade do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. em relação aos hospedeiros testados. Apenas *M. javanica* População 1 (P1), P2, P3, P4 e P5), *M. incognita* (raças 1, 2, 4 e P2) e uma população mista de *M. javanica* e *M. incognita* puderam ser considerados como hospedeiros desse isolado.

O isolado P1-UFLA foi mais agressivo para *M. javanica* (P3 e P4) e *M. incognita* (raças 1,2 e 4 e população P2).

Ocorreu resistência parcial de uma população mista (*M. javanica* + *M. incognita*) ao ataque do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp.

A mobilidade dos J₂ de *M. javanica* e *M. incognita* não foi afetada pela centrifugação e pela presença de endósporos na cutícula, pelo método empregado.

A idade dos J₂ de *M. javanica* não afetou a adesão de endósporos de *Pasteuria* à cutícula, quando se utilizou o método da centrifugação.

A morte dos J₂ de *M. javanica* e *M. incognita* pelo calor diminuiu drasticamente o número de endósporos de *Pasteuria* sp. aderidos à cutícula.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAVIES, K.G.; DANKS, C. Interespecific differences in the nematode surface coat between *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* related to the adhesion of the bacterium *Pasteuria penetrans*. *Parasitology*, Cambridge, v.105, p.475-480, 1992.
- DAVIES, K.G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*, Warwickshire, v.112, n.3, p.491-501, June 1988.
- DAVIES, K. G.; LAIRD, V. E. KERRY, B. R. The mobility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Revue de Nématologie*, Montrouge Cedex, v.14, n.4, p. 611-618, oct. 1991.
- DAVIES, K.G.; REDDEN, M.; PEARSON, T.K. Endospore heterogeneity in *Pasteuria penetrans* related to adhesion to plant-parasitic nematodes. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.19, n.5, p.370-373, Nov. 1994.
- DAVIES, K.G.; ROBINSON, M.P.; LAIRD, V.E. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v.59, n.1, p.18-23, Jan. 1992.
- DUTKY, E.M.; SAYRE, R.M. Some factors affecting infection of nematodes by bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.10, n.4, p.285, Oct. 1978. (Resumos)

- EPSTEIN, E. **Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas.** Tradução e Notas MALAVOLTA, E. Rio de Janeiro: Livros técnicos e Científicos/São Paulo: Universidade de São Paulo, 1975. 341p.
- FATTAH, F.A.; SALEH, H.M.; ABOUD, H.M. Parasitism of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by *Pasteuria penetrans* in Iraq. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.21, n.3, p.431-433, July 1989.
- HEWLETT, T.E.; DICKSON, D.W. A centrifugation method for attaching endospores of *Pasteuria* spp. to nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.25, n.4, p.785-788, Dec. 1993. (Suplemento)
- HUANG, S.P.; RESENDE, I.C.; SOUZA, P.E.; CAMPOS, V.P. Effect of aldicarb, ethoprop, and carbofuran on control of coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.15, n.4, p.510-514, Oct. 1983.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, n.9, p.692, Sept. 1964.
- MANKAU, R.; PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. **Journal of nematology**, Lakeland, v.9, n.1, p.40-45, Jan. 1977.
- 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, v.22, n.4, p.525-531, Oct. 1990.
- RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R.; HAGUE, N.G.M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.19, p.225-227, dic. 1991.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.129, n.2, p.1091-1101, 1977.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.1, p.55-60, Jan. 1984.
- STIRLING, G.R. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. **Nematologica**, Leiden, v.31, n.2, p.203-209, Apr. 1985.

- STIRLING, G.R.; BIRD, A.F.; CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie*, Montrouge Cedex, v.9, n.3, p.251-260, Nov. 1986.
- STURHAM, D.; WINKELHEIDE, R.; SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Light and electron microscopical studies of the life cycle and developmental stages of *Pasteuria* isolate parasitizing the pea cyst nematode, *Heterodera goettingiana*. *Fundamental and Applied Nematology*, Montrouge Cedex, v.17, n.1, p.29-42, jan. 1994.
- TZORTZAKAKIS, E.A.; GOWEN, S.R. Resistance of *Meloidogyne* spp. to parasitism by the obligate parasite *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, Leiden, v.40, n.2, p.258-266, Apr. 1994.

6 CAPÍTULO III

QUANTIFICAÇÃO DE ENDÓSPOROS DE *PASTEURLIA SP.* EM SOLO E RAÍZES

RESUMO

SOUZA, Jorge Teodoro de. Quantificação de endósporos de *Pasteuria* sp. em solo e raízes. In: ____ **Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides**. Lavras: UFLA, 1997. Cap. 3, p. 79-98. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

Compararam-se três métodos para a quantificação de endósporos de *Pasteuria* sp. em raízes de tomateiro. O método de digestão enzimática permitiu detectar mais endósporos/g de raiz que os demais testados. Para a estimativa do número de endósporos de *Pasteuria* sp. em solos infestados, realizaram-se biotestes, nos quais juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* raça 1 sadios foram adicionados em solos infestados com endósporos da bactéria, estimando-se após um período de incubação de 3 dias, o número de endósporos/J₂ e a percentagem de infestação desses J₂. Os dados obtidos desses biotestes foram interpretados em curvas-padrão construídas empregando-se solo argiloso e areia livres de endósporos de *Pasteuria* sp., adicionados de quantidades conhecidas de endósporos e posteriormente submetidos ao bioteste. Os solos testados apresentaram concentrações de endósporos variando de 785,71 a 5.238,10 endósporos/g. Essas concentrações foram consideradas insuficientes para suprimir as populações de *Meloidogyne* spp.

ABSTRACT

Quantification of *Pasteuria* sp. endospore concentrations in soil and in tomato roots

Three methods for quantification of the concentrations of *Pasteuria* sp. concentrations from tomato root material were compared. The enzymatic disruption method gave the highest estimation of endospores/g of root material. To estimate the endospore concentrations of *Pasteuria* sp. in infested soils, a bioassay technique was used. In this technique, healthy second stage juveniles (J₂) of *M. incognita* race 1 were added into soils infested with *Pasteuria* sp. endospores. After 3 days of incubation, the number of endospores/J₂ and the percentage of infested J₂ were evaluated. The data were interpreted using standard curves constructed in sand and clay soils free of *Pasteuria* endospores, but added with known endospore concentrations and submitted to the bioassay. The evaluated soils showed endospore concentrations of 785.71 to 5,238.10 endospores/g. These concentrations were considered insufficient to suppress *Meloidogyne* spp. populations.

6.1 INTRODUÇÃO

Pasteuria spp. são bactérias antagonistas de nematóides, caracterizadas pela natureza obrigatória de seu parasitismo e pela especificidade de hospedeiros (Stirling, 1991). O ciclo de vida da bactéria ocorre inteiramente no interior do corpo do nematóide suscetível. Endósporos infectivos encontrados no solo ou em raízes aderem-se à cutícula das formas móveis dos nematóides hospedeiros, germinam e penetram através da cutícula, e no pseudoceloma ocorre o crescimento vegetativo e a esporulação. Após a morte e decomposição do nematóide os endósporos são liberados no solo, reiniciando o ciclo (Sayre, 1980).

Os endósporos da bactéria, que são altamente resistentes à dissecação, altas temperaturas e nematicidas (Dutky e Sayre, 1978; Stirling, 1984), constituem o único estágio do ciclo passível de aplicação prática no campo. Através da aplicação de endósporos no solo, em experimentos instalados em condições controladas de casa de vegetação (Dube e Smart Jr., 1987) e em microparcels instaladas no campo (Brown, Kepner e Smart Jr., 1985; Chen et al., 1996), foi demonstrado o potencial da bactéria como agente de controle biológico dos nematóides formadores de galhas.

Devido à natureza obrigatória de seu parasitismo, *Pasteuria* ainda não foi cultivada com sucesso em meios de cultura artificiais (Williams et al., 1989). Dessa forma, o método mais usado para a produção massal da bactéria, principalmente para propósitos experimentais, é o de Stirling e Wachtel (1980), no qual raízes secas e moídas de tomateiro altamente infestadas com fêmeas de *Meloidogyne* spp. parasitadas por *Pasteuria* sp. constituem a fonte de inóculo. A quantificação desses endósporos nas

raízes é importante para a padronização da quantidade de inóculo utilizada nos experimentos, uma vez que cada preparação (raiz moída) possui uma concentração de endósporos diferente.

A quantificação de endósporos no solo é um importante parâmetro na avaliação da supressividade à nematóides. Essa quantificação tem sido feita através de biotestes (Slana e Sayre, 1981; Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1988), nos quais solos infestados com endósporos são incubados com nematóides sadios, sendo o número de endósporos aderidos em cada nematóide contado depois de 3 dias de incubação e os resultados interpretados com base em uma curva padrão. Solos de campo onde obteve-se o controle de *M. javanica* através da aplicação de endósporos de *Pasteuria* apresentaram 80 % dos J₂ com 10 ou mais endósporos na cutícula quando submetidos ao bioteste (Stirling, 1984).

Com este trabalho objetivou-se comparar 3 métodos para a quantificação de endósporos em raízes de tomateiro e o desenvolvimento de curvas padrão que permitam a interpretação de resultados obtidos em biotestes com solos infestados.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Quantificação de Endósporos em Raízes

Raízes contendo fêmeas de *M. incognita* e *M. javanica* parasitadas pelo isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. foram obtidas de um plantio de tomate em microparcelas instaladas no campo (pág. 37 do capítulo I). Essas raízes foram secas e moídas em um micro moinho (Marconi MA 048) até que todo o material passasse por uma peneira de 10 malhas. Este material foi utilizado para avaliar três métodos de quantificação de endósporos em raízes:

Método 1 (Digestão enzimática) - uma amostra de 0,5 g de raízes secas e moídas foi colocada em 1,0 ml de uma solução 2% de pectinase-celulase (Sigma Chemicals Ltd) por 3 horas a 37 °C. O material foi transferido para um almofariz de 6 cm de diâmetro, juntamente com 5 ml de água e triturado com um pistilo até a total desintegração. O material triturado foi transferido para uma proveta e o volume completado para 50 ml, sendo os endósporos contados em câmara de Newbauer a 500 X.

Método 2 (Trituração) - uma amostra de 0,5 g de raízes secas e moídas foi transferida para um almofariz, triturada, diluída e quantificada como descrito para o método 1.

Método 3 (Diluição) - uma amostra de 0,5 g de raízes secas e moídas foi colocada em uma proveta e o volume completado para 50 ml, homogeneizada e quantificada como descrito para o método 1.

Em cada um desses métodos foram feitas um total de 42 leituras, que foram divididas em sete grupos de seis e as médias desses grupos constituíram as sete repetições do experimento. As médias foram transformadas por \sqrt{x} , sendo a análise de variância e o teste de médias processados no SAS System 6.10, considerando um delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Esses métodos foram selecionados para esse ensaio pois são semelhantes aos melhores já desenvolvidos e publicados (Sharma e Stirling, 1991; Sharma e Stirling, 1993; Chen, Dickson e Hewlett, 1996).

6.2.2 Quantificação de Endósporos em Solo

Utilizou-se um método indireto para a quantificação de endósporos em solos infestados, o qual consistiu-se no desenvolvimento de uma curva padrão, onde concentrações conhecidas de endósporos foram adicionados no solo, avaliando-se posteriormente o número médio de endósporos em J_2 hospedeiros e a percentagem de J_2 infestados. Após o desenvolvimento dessa curva foi possível a estimativa do número de endósporos em solos infestados que possuíssem características próximas às daquele empregado na confecção da curva padrão. Solo e areia lavada, livres de endósporos de *Pasteuria*, foram empregados separadamente para a confecção das curvas padrão. Utilizou-se uma suspensão de endósporos do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp., com concentração $3,25 \times 10^6$ endósporos/ml, preparada como descrito anteriormente (pág. 64 do capítulo II). Empregaram-se J_2 de *M. incognita* raça 1, pois em testes iniciais (resultados não apresentados) estes mostraram-se mais suscetíveis aos endósporos da bactéria presentes em solos infestados. Os J_2 com no máximo 24 horas de idade foram obtidos conforme descrito na pág. 65 do capítulo II. Em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo 10 g de solo ou areia, foram adicionadas e homogeneizadas alíquotas da suspensão de endósporos, de maneira a se obter 0, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000 e 500.000 endósporos/g de solo ou areia. Para a obtenção dessas

quantidades de endósporos, adicionaram-se respectivamente 0; 1,5; 3,0; 15,3; 30,7; 153,9; 307,7 e 1.538,5 μl da suspensão juntamente com 2 ml de água destilada em cada placa. Em seguida, com um bastão de vidro, homogeneizou-se o solo e, 500 ± 22 J_2 (média \pm desvio padrão) de *M. incognita* raça 1 em 3 ml de água destilada foram adicionados às placas. Essas placas foram vedadas com rolopak e permaneceram por 3 dias a temperatura de aproximadamente 27 °C. Após esse período de incubação, os J_2 foram extraídos utilizando-se a técnica de Jenkins (1964), sendo o número de endósporos/ J_2 e a percentagem de infestação avaliados em 20 J_2 de cada placa sob microscópio ótico a 250X. Os ensaios empregando-se solo e areia foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. O número médio de endósporos/ J_2 e a percentagem média de infestação foram transformados por $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos a análise de variância e análise de regressão no SAEG 5.0. Foram feitas as análises dos resíduos para verificar o ajuste das equações (Neter, Wasserman e Kutner, 1990).

Solos infestados com endósporos de *Pasteuria* sp. originados de microparcels instaladas no campo, em área do DFP/UFLA (Microp. 02; 06; 07; 12 e 18), de um canteiro cultivado com *Heliconia* sp. do DAG/UFLA (Floríc.), de um pomar de citros localizado em Luminárias, MG (Lumin.), bem como solo infestado com endósporos de *Pasteuria* sp. obtido da horta da UFLA (Horta 01; 02 e 03) foram usados para a quantificação através deste bioteste. Amostras de todos os solos estudados, incluindo os usados para a confecção das curva padrão foram analisadas no Departamento de Ciências do Solo/UFLA (Tabela 3). Alíquotas de 10 g desses solos em placas de Petri de 5 cm de diâmetro foram incubadas com 500 ± 22 J_2 de *M. incognita* raça 1, extraídos e avaliados como descrito anteriormente. O número médio de endósporos aderidos em cada J_2 e a percentagem de J_2 com endósporos aderidos foram utilizados para estimar o número de endósporos presentes nos solos testados. Através da realização de biotestes em solos infestados com endósporos e da interpretação na curva padrão feita em solo (Figuras 11 e 12; tabela 5), resultou a tabela 6. Para estimar o número de endósporos no solo, utilizaram-se os dados originais e os transformados.

TABELA 3. Características químicas e físicas dos solos utilizados para a quantificação de endósporos de *Pasteuria* sp. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Origem dos solos testados	Características					
	pH em água	Carbono (%)	Mat. Org. (%)	Areia (%)	Limo (%)	Argila (%)
01- Curva solo	5,3	2,1	3,7	26	48	46
02- Curva areia	6,3	0,1	0,1	96	0	4
03- Floric.	5,9	1,8	3,1	28	22	50
04- Lumin.	5,7	1,8	3,1	70	14	16
05- Microp. 02	5,8	1,8	3,1	26	34	40
06- Microp. 06	6,3	1,8	3,1	26	34	40
07- Microp. 07	6,9	2,0	3,4	26	34	40
08- Microp. 12	5,7	1,8	3,1	24	34	42
09- Microp. 18	6,5	1,8	3,1	40	34	26
10- Horta 01	5,8	2,0	3,4	32	34	34
11- Horta 02	5,9	1,8	3,1	36	34	30
12- Horta 03	6,6	1,8	3,1	28	36	36

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Quantificação de Endósporos em raízes

O método 1 envolvendo a digestão enzimática das raízes de tomateiro infestadas por *Pasteuria* permitiu a detecção de mais endósporos/g de raiz do que os demais testados (Tabela 4), confirmando os resultados obtidos por Sharma e Stirling (1993), que utilizando um método semelhante à digestão enzimática obtiveram 247,7 % de aumento na detecção de endósporos em raízes moídas, quando comparado com o método padrão utilizado por Stirling e Wachtel (1980). O método de trituração foi o segundo na eficiência para a detecção de endósporos de *Pasteuria* em raízes (Tabela 4), ainda com boa eficiência seguiu-se o método de diluição. De fato, os melhores métodos testados por Chen, Dickson e Hewlett (1996) foram semelhantes aos métodos de trituração (método 2) e de diluição (método 3), empregados neste trabalho.

TABELA 4. Comparação de métodos para a quantificação de endósporos de *Pasteuria* sp. em raízes de tomateiro. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Método	Endósporos/g de raiz	Comparação **
1 - Digestão Enzimática	46.309.523,81 ± 3.908.075,44 *	A
2 - Trituração	32.380.952,38 ± 898.789,81	B
3 - Diluição	22.619.047,62 ± 1.987.299,05	C

* Média de 7 repetições com erro padrão

** Teste de Tukey a 5%

Sharma e Stirling (1991), utilizando um método semelhante à digestão enzimática, encontraram de 1,08 a 25,91 vezes mais endósporos/g de raiz que o detectado neste trabalho. Esses autores estimaram a eficiência do método como sendo 100 %. Chen, Dickson e Hewlett (1996) detectaram respectivamente 1,8 e 1,71 vezes mais endósporos que os aqui detectados, utilizando métodos semelhantes à trituração (método 2) e à diluição (método 3). Essas diferenças no número de endósporos detectados se devem à concentração dos mesmos nas raízes utilizadas.

O método 1 mostrou-se de fácil execução, obtendo-se uma suspensão clara e de fácil contagem, pois os endósporos são totalmente desagregados pela enzima, podendo o método ser usado rotineiramente em qualquer laboratório.

6.3.2 Quantificação de Endósporos em solo

6.3.2.1 Curvas padrão em solo e areia

As curvas padrão confeccionadas em solo argiloso e areia apresentaram ajustes diferenciados (Figuras 11 e 12). Na curva padrão feita em solo, tanto para o número médio de endósporos/ J_2 quanto para a percentagem de J_2 com endósporos aderidos, ajustaram-se equações de regressão do segundo grau, enquanto que para a curva em areia, as equações ajustadas foram de terceiro grau. As equações de regressão apresentaram um bom ajuste, pois além dos altos valores de R^2 , a análise dos resíduos padronizados revelou que 100 % deles apresentaram valores entre -1,96 e + 1,96 (Neter, Wasserman e Kutner, 1990).

No solo, os endósporos de *Pasteuria* sp. mostraram-se menos disponíveis para a adesão nos J_2 que em areia, sugerindo que diferentes classes texturais de solos influenciam a estimativa do número de endósporos. Por exemplo, a observação de uma média de 20 endósporos/ J_2 em biotestes feitos em areia corresponde a uma estimativa de 10.000 endósporos/g (Figura 12), enquanto que em solo o valor estimado para o número de endósporos/g é de 175.000 (Figura 11), portanto, um valor 17,5 vezes maior.

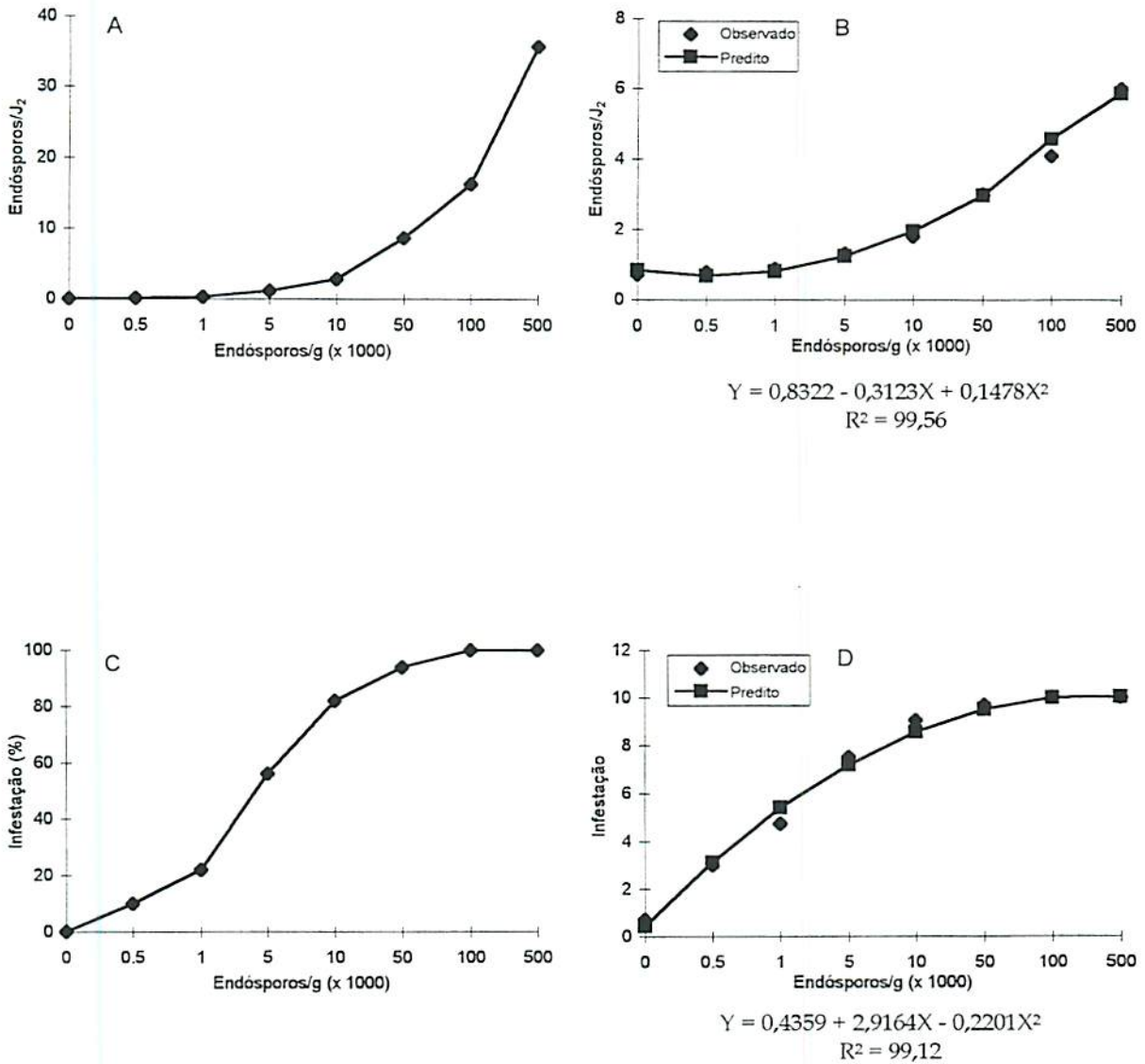


FIGURA 11. Curva padrão em solo. (A) Número médio de endósporos de *Pasteuria* sp./J₂ de *M. incognita* raça 1 em solo com diferentes concentrações de endósporos, (B) Curva ajustada aos dados, (C) Percentagem média de J₂ com endósporos aderidos à cutícula, (D) Curva ajustada aos dados. UFLA, Lavras - MG, 1997.

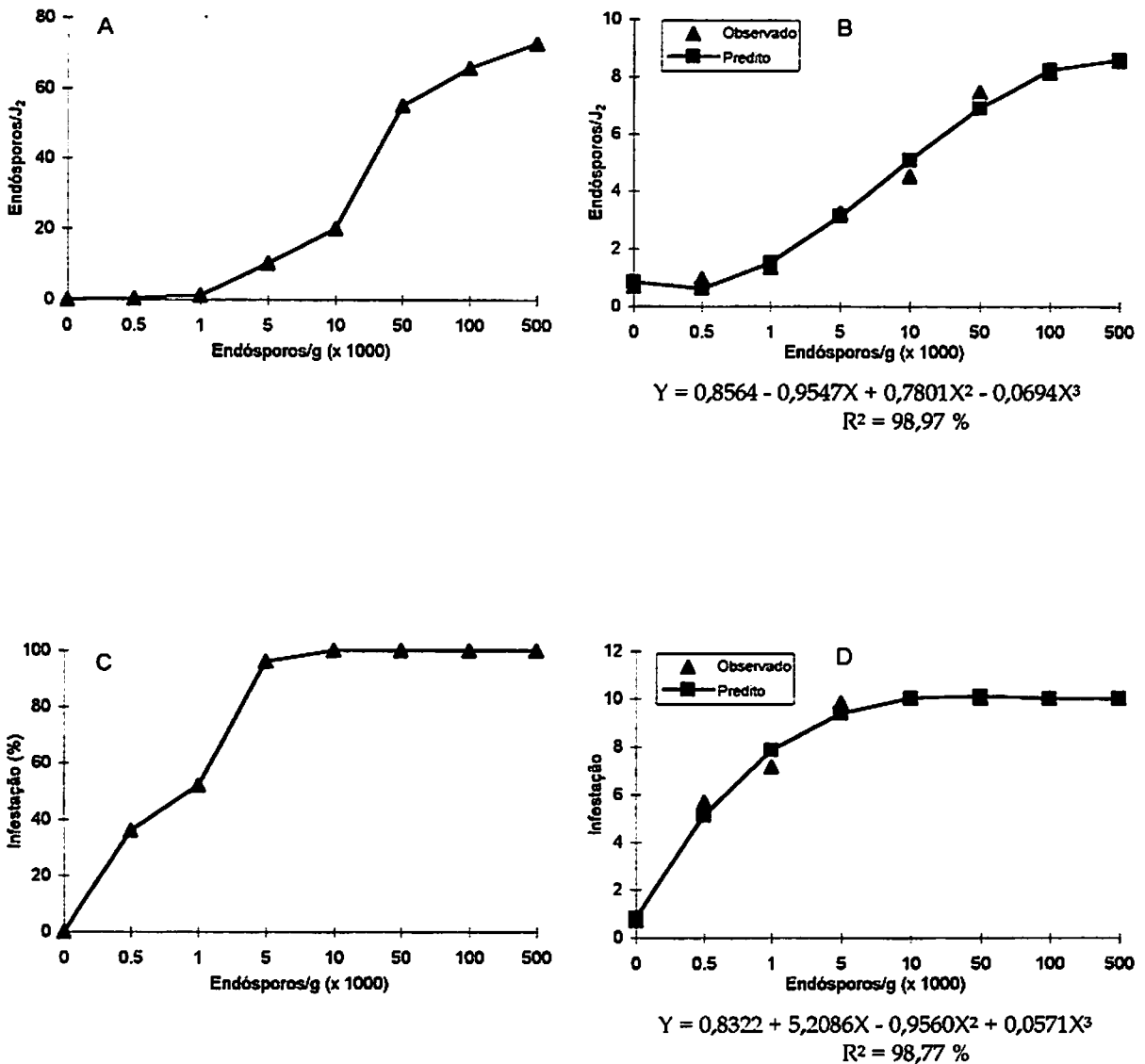


FIGURA 12. Curva padrão em areia. (A) Número médio de endósporos de *Pasteuria* sp./J₂ de *M. incognita* Raça 1, em areia com diferentes concentrações de endósporos, (B) Curva ajustada aos dados, (C) Percentagem média de J₂ com endósporos aderidos à cutícula, (D) Curva ajustada aos dados. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Em areia, necessita-se de 10.000 endósporos/g para que 100 % dos J₂ tenham no mínimo 1 endósporo aderido na cutícula, enquanto que em solo, são necessários 100.000 endósporos/g para a infestação de 100 % dos J₂, portanto, um valor 10 vezes maior em solo. Esses resultados podem ajudar no entendimento dos dados obtidos por Spaull (1984) e Mousa (1992), quando constataram os solos arenosos como mais favoráveis à ocorrência da bactéria no campo e seu desenvolvimento em microparcelas. Apesar dos solos arenosos favorecerem a lixiviação de endósporos, esses parecem ser mais disponíveis para a adesão que em solos argilosos. No Senegal, Dabiré et al. (1996) observaram em ensaios de laboratório que 67,7 % dos endósporos de *Pasteuria* e 78 % dos J₂ de *M. javanica* foram lixiviados em solos arenosos, apesar da grande reprodução de *M. javanica* nesses solos em condições de campo. Em solos argilosos apenas 0,12 % dos endósporos e 10,6 % dos J₂ foram lixiviados. Mas, 50 % dos endósporos permaneceram neste solo após a extração, entretanto, não disponíveis para a adesão em J₂. A menor disponibilidade dos endósporos de *Pasteuria* sp. em solos argilosos provavelmente possa ser explicada pelo tamanho das partículas. Nesta hipótese, os endósporos ficariam mais protegidos pelas partículas menores encontradas em solos argilosos, dificultando seu contato com os J₂, o que não acontece em solos arenosos, pois esses solos possuem uma textura grossa. Uma vez que os endósporos possuem uma rede de cargas negativas em sua superfície (Afolabi, Davies e O'Shea, 1995), a capacidade de troca de cátions (CTC) dos solos argilosos não parece ser a responsável pela adsorção dos mesmos. Segundo Himmelhoch, Kisiel e Zuckerman (1977) citados por Afolabi, Davies e O'Shea, (1995) a carga da superfície da cutícula dos nematóides também é negativa, o que significa que as forças eletrostáticas entre a cutícula do nematóide e da superfície dos endósporos são opostas à adesão. Entretanto, essa oposição não ocorre na natureza, sugerindo que outras forças, principalmente interações hidrofóbicas entre os endósporos da bactéria e a superfície da cutícula do nematóide ocorrem. Essas forças, influenciadas principalmente pelo pH e pela concentração do eletrólito podem também estar presentes na interação entre as partículas do solo e os endósporos da bactéria. Uma outra hipótese, é o efeito da textura

sobre a mobilidade dos J₂. Em areia, os macroporos, facilitam a oxigenação e consequentemente a mobilidade.

6.3.2.2 Quantificação

Os solos analisados apresentaram concentrações de endósporos variando de 785,71 a 5.238,10 endósporos/g (Tabela 6). Essas concentrações de endósporos são consideradas insuficientes para produzir reduções significativas nas densidades populacionais de *Meloidogyne* spp. Segundo Chen et al. (1996) a concentração mínima de endósporos necessária para suprimir populações de *M. arenaria* raça 1 em plantios de amendoim na Florida foi de 10.000 endósporos/g de solo. Entretanto, esse mínimo pode ser maior em nossas condições, pois os solos brasileiros são mais argilosos. Enquanto os solos infestados testados no Brasil possuem de 28 a 40 % de areia, os testados por Chen et al. (1996) possuíam mais de 90 %.

TABELA 5. Número de endósporos/g de solo em função do número de endósporos de *Pasteuria* sp./J₂ e percentagem de J₂ com endósporos aderidos na cutícula (dados originais, dados transformados e dados preditos pela regressão). UFLA, Lavras - MG, 1997.

Parâmetros	Número de endósporos/g de solo							
	0	500	1.000	5.000	10.000	50.000	100.000	500.000
End./J ₂ (original)	0	0,12	0,26	1,12	2,8	8,64	16,34	35,86
% infest. (original)	0	10	22	56	82	94	100	100
End./J ₂ (transf.)	0,71	0,79	0,87	1,30	1,80	3,01	4,10	6,02
% infest. (transf.)	0,71	2,99	4,73	7,51	9,07	9,71	10,02	10,02
End./J ₂ (predito)	0,83	0,67	0,80	1,23	1,95	2,97	4,59	5,89
% infest. (predito)	0,44	3,13	5,39	7,20	8,58	9,51	10,01	10,06

Em biotestes realizados empregando-se o solo "Lumin." obtido de um pomar de citros em Luminárias - MG, não foi observada nenhuma adesão de endósporos em J₂ de *M. incognita* raça 1 (Tabela 6), apesar de terem sido encontrados J₂ e machos de *Tylenchulus semipenetrans* infestados e parasitados neste solo (pág. 51 do capítulo I), confirmando a especificidade do isolado de *Pasteuria* sp. parasita do nematóide dos citros (Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1988).

TABELA 6. Número médio de endósporos de *Pasteuria* sp./J₂, percentagem média de J₂ infestados (dados originais e dados transformados) e número estimado de endósporos/g de solo utilizando-se os dados originais e os transformados, em diferentes amostras de solo. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Origem dos solos testados	Parâmetros							
	End./J ₂ (original) 1	% infest. (original) 2	End./g (estimado de 1)	End./g (estimado de 2)	End./J ₂ (transf.) 3	% infest. (transf.) 4	End./g (estimado de 3)	end./g (estimado de 4)
01- Floric.	0,22	12	857,14	583,33	0,85	3,54	875	658,05
02- Lumin.	0	0	0	0	0,71	0,71	0	0
03- Microp. 02	0,38	24	1558,14	1235,29	0,94	4,95	1651,16	1316,55
04- Microp. 06	1,08	55	4813,95	4882,35	1,54	7,45	4627,91	4913,67
05- Microp. 07	1,03	48	4581,39	4058,82	1,24	6,96	4441,86	4208,63
06- Microp. 12	1,2	55	5238,10	4882,35	1,64	7,45	5000	4913,67
07- Microp. 18	0,65	32	2813,95	2176,47	1,07	5,7	2860,47	2395,68
08- Horta 01	0,22	22	857,14	1000	0,85	4,74	875	1014,39
09- Horta 02	0,2	20	785,71	916,67	0,84	4,53	812,5	942,53
10- Horta 03	0,46	30	1930,23	1941,18	0,98	5,52	2023,26	2136,69

6.4 CONCLUSÕES

Utilizando-se o método de digestão enzimática obteve-se um maior número de endósporos/g de raízes de tomateiro.

Em solo argiloso, os endósporos de *Pasteuria* sp., mostraram-se menos disponíveis para a adesão em J₂, quando comparado com a areia lavada.

O número de endósporos presente nos solos testados foi considerado insuficiente para supressão dos nematóides formadores de galhas.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFOLABI, P.; DAVIES, K.G.; O'SHEA, P.S. The eletrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.244-249, Sept. 1995.
- BROWN, S. M.; KEPNER, J. L.; SMART Jr. , G. C. Incresead crop yields following aplication of *Bacillus penetrans* to field plots infested with *Meloidogyne incognita*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.17, n.4, p.483-486, July/ Aug. 1985.
- CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W.; HEWLETT, T.E. Quantification of endospore concentrations of *Pasteuria penetrans* in tomato root material. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.28, n.1, p.50-55, Mar. 1996.
- CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W.; McSORLEY, R.; MITCHELL, D.J.; HEWLETT, T.E. Supression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.28, n.2, p.159-168, June 1996.
- DABIRÉ, K.R.; MATEILLE, T.; DIOP, M.T.; N'DIAYE, S.; DUPONNOIS, R. Influence of the soil on the availability of *Pasteuria penetrans* to paratize nematodes in the genus *Meloidogyne*. In: INTERNATIONAL NEMATOLOGY CONGRESS, 3, Gosier, 1996. **Proceedings ...** Guadaloupe: Antilles, 1996. p.182.
- DUBE, B.N.; SMART JR., G.C. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Pacilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.19, n.2, p.222-227, Apr. 1987.

- DUTKY, E.M.; SAYRE, R.M. Some factors affecting infection of nematodes by bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.10, n.4, p.285, Oct. 1978. (Resumos)
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, n.9, p.692, Sept. 1964.
- MOUSA, E.M. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* with *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.4, p.609, Oct. 1992. (Resumos)
- NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. Diagnostics and remedial measures I. In: _____. **Applied Linear Statistical Models**. Burr Ridge: R.R. Donnelley & Sons Company, 1990. p.113-158.
- OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Soil bioassay and host specificity of populations of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.26, n.4, p.654, Oct. 1988. (Resumos)
- SAYRE, R.M. Promising organisms for biological control of nematodes. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, n.6, p.526-532, June 1980.
- SHARMA, R.D.; STIRLING, G.R. "In vivo" mass production systems for *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.37, n.4, p.483-485, Sept. 1991.
- SHARMA, R.D.; STIRLING, G.R. A method for the extraction and quantification of *Pasteuria penetrans* spores in root material. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.1, p.110-111, mar. 1993.
- SLANA, L.J.; SAYRE, R.M. A method for measuring incidence of *Bacillus penetrans* spore attachment to the second-stage larvae of *Meloidogyne* spp. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.13, n.4, p.461, Oct. 1981. (Resumos)
- SPAULL, V.W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v.7, n.3, p.277-282, avr. 1984.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.1, p.55-60, Jan. 1984.

STIRLING, G.R. **Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects.** Melksham: Redwood Press, 1991. 282p.

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

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

7 CAPÍTULO IV

EFEITO DO ISOLADO P1-UFLA DE *PASTEURIA* SP. SOBRE A PRIMEIRA
GERAÇÃO DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* (TREUB) CHITWOOD

RESUMO

SOUZA, Jorge Teodoro de. Efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. In: ____ **Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* sp. em fitonematóides**. Lavras: UFLA, 1997. Cap. 4, p. 99-114. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

Estudou-se em condições de laboratório o efeito de diferentes níveis de inóculo do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. sobre o desenvolvimento da primeira geração de *Meloidogyne javanica*. Para isto, juvenis do segundo estágio (J₂) de *M. javanica* contendo em média 0; 2; 5; 11 e 23 endósporos/J₂ foram inoculados em mudas de tomateiros plantados em copos plásticos mantidos em laboratório e irrigados com solução nutritiva. Após 35 dias da inoculação, avaliaram-se o número de fêmeas nas raízes, número de fêmeas parasitadas e o número de ovos produzidos por sistema radicular. Observou-se uma redução média de até 69 % no número de fêmeas nas raízes, a percentagem média de parasitismo atingiu $93,15 \pm 4,72$, havendo uma redução da ordem de 99,09 % na produção de ovos, quando foram inoculados J₂ com uma média de 23 endósporos aderidos na cutícula. Fêmeas parasitadas produzindo poucos ovos foram observadas durante a avaliação do parasitismo. Obteve-se correlação negativa entre o número total de fêmeas e o número de fêmeas parasitadas ($p=0,0057$) e também entre o número de fêmeas parasitadas e o número de ovos ($p<0,0001$) e correlação positiva entre o número total de fêmeas e o número de ovos ($p<0,0001$).

ABSTRACT

Effect of the isolate P1-UFLA of *Pasteuria* sp. on the first generation of *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood

The effect of different inoculum levels of P1-UFLA isolate of *Pasteuria* sp. on the first generation of *M. javanica* was studied under laboratory conditions. Second stage juveniles (J₂) with 0; 2; 5; 11 and 23 endospores were inoculated in tomato seedlings planted in plastic cups maintained in laboratory and watered with nutrition solution daily. After 35 days of the inoculation, the number of females per root system, the number of parasitized females and the number of eggs produced per root system were assessed. When the inoculated J₂ had an average of 23 endospores attached to the cuticle, the reduction of female number in root systems reached 69 %. The percentage of parasitism was 93.15 ± 4.72 and the egg production was reduced by 99.09 %. Parasitized females produced fewer eggs. Negative correlation was obtained between the total number of female per root system and the number of parasitized females ($p=0.0057$) and also between the number of parasitized females and the number of eggs produced ($p<0.0001$). A positive correlation was observed between the total numbers of females and the number of eggs produced ($p<0.0001$).

7.1 INTRODUÇÃO

As bactérias formadoras de endósporos e pseudomicélio do “grupo *Pasteuria penetrans*” (Thorne) Sayre e Starr são parasitas obrigatórias de diversas espécies de nematóides. Os isolados da bactéria capazes de parasitar nematóides do gênero *Meloidogyne* Goeldi são mais estudados devido à importância econômica desse grupo de nematóides (Brown, Kepner e Smart Jr., 1985). O potencial de *Pasteuria* como agente de controle biológico de nematóides das galhas está relacionado à sua capacidade de reduzir a penetração de juvenis do segundo estágio (J₂) nas raízes da planta hospedeira e a sua capacidade de impedir ou reduzir drasticamente a produção de ovos por fêmeas (Stirling, 1984). A resistência dos endósporos à altas temperaturas, dessecação e nematicidas (Dutky e Sayre, 1978; Stirling, 1984) são outros atributos importantes. Os endósporos de *Pasteuria* sp. presentes no solo aderem-se aos J₂ de *Meloidogyne* spp. que se movimentam em solos infestados germinam e penetram através da cutícula depois que o nematóide inicia sua alimentação na planta hospedeira. No pseudoceloma do hospedeiro ocorre o crescimento vegetativo e a produção de endósporos. No final do ciclo, as raízes e a cutícula da fêmea sofrem decomposição liberando os endósporos no solo (Sayre, 1980).

Em vários países, reduções populacionais dos nematóides formadores de galhas têm sido demonstradas em experimentos conduzidos em condições controladas de casa de vegetação e em microparcelas instaladas no campo (Mankau e Prasad, 1977; Dube e Smart Jr., 1987; Chen et al., 1996), através do emprego de isolados bem caracterizados,

como o P20 estudado na Florida (Oostendorp, Dickson e Mitchell, 1991; Hatz e Dickson, 1992; Hewlett e Dickson, 1993; Chen et al., 1996).

No Brasil, são poucos os estudos de isolados dessa bactéria. Necessita-se pois de avaliações de isolados nativos quanto a eficácia do parasitismo em fitonematóides e do potencial no controle biológico de *Meloidogyne*.

Objetiva-se com este trabalho estudar o efeito de diferentes níveis de inóculo do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. sobre a primeira geração de *M. javanica* em condições de laboratório.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se o isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp., que foi obtido de raízes de tomateiro coletadas de microparcels instaladas no campo (pág. 37 do capítulo I). A partir de raízes frescas preparou-se uma suspensão de endósporos com concentração $5,9 \times 10^6$ endósporos/ml como descrito na pág. 64 do capítulo II. Os ovos de *M. javanica* população 2 (P2) foram obtidos conforme descrito na pág. 65 do capítulo II. Os J₂ de *M. javanica* foram obtidos conforme descrito na pág. 66 do capítulo II. Para tubos do tipo eppendorf foram transferidos em 500 µl de água destilada cerca de 200 J₂ de *M. javanica* e adicionados de quantidades diferentes de endósporos da bactéria de maneira a se obter uma média de 0; 2; 5; 11 e 23 endósporos/J₂, em 4 repetições. Em cada 4 repetições adicionaram-se respectivamente 0; 12,5; 25; 50 e 200 µl da suspensão. Os J₂ foram transferidos para vidros de relógio e sob microscópio ótico de objetivas invertidas foram coletados apenas J₂ vivos contendo as quantidades de endósporos citadas anteriormente, em 4 repetições de 100 J₂. Esses J₂ foram inoculados em plantas de tomateiro com 4 semanas de idade, contadas a partir da sementeira. Os tomateiros foram plantados em copos plásticos contendo 100 g de areia autoclavada, mantidos em laboratório a temperatura de aproximadamente 27 °C e irrigadas com solução nutritiva de Johanson et al. (1957) citada por Epstein (1975). Depois de 35 dias da inoculação, as raízes foram coletadas, imersas separadamente em solução de citolase (Genencor Rochester International, NY) a 50 % e as fêmeas coletadas conforme descrito na pág. 38 do capítulo I. Avaliaram-se o número total de fêmeas em cada sistema radicular, o

número de fêmeas parasitadas e a quantidade de ovos produzidos em cada sistema radicular. Para a avaliação da quantidade de ovos nas raízes, após a avaliação do número total de fêmeas e de fêmeas parasitadas, essas, juntamente com as raízes foram trituradas em liquidificador por 45 segundos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5 %, passadas em peneiras de 200 e 400 malhas, sendo os ovos coletados na última peneira e contados sob microscópio a 125X.

Os dados referentes ao número total de fêmeas nas raízes, percentagem de fêmeas parasitadas e número de ovos nas raízes foram transformados por $\sqrt{x+0,5}$, submetidos à análise de variância e análise de regressão, considerando-se um delineamento em blocos casualizados (DBC) e correlação no SAEG 5.0. (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas). O ajuste das equações foi verificado através do R^2 e da técnica de análise dos resíduos (Neter, Wasserman e Kutner, 1990).

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento do número de endósporos do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. nos J₂ de *M. javanica* provocou um aumento ($p < 0,0001$) na percentagem de parasitismo e decréscimo ($p = 0,0264$) no número de fêmeas nas raízes e no número de ovos ($p < 0,0001$) produzidos por essas fêmeas, considerando-se a primeira geração do hospedeiro (Figuras 12, 13 e 14 e Tabela 7).

TABELA 7. Efeito de diferentes níveis de inóculo sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica*, dados originais. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Avaliações	Número de Endósporos/J ₂				
	0	2	5	11	23
Média Núm. Total de fêmeas	42,75 ± 5,88 *	31,25 ± 10,40	32,5 ± 11,15	26,75 ± 10,34	13,25 ± 6,10
% redução de fêmeas	0	26,9	23,98	37,43	69
Número de ovos	12862 ± 1172,99	5483 ± 1859,78	3827,75 ± 1690,74	1370 ± 677,18	117,5 ± 71,46
% redução de ovos	0	57,37	70,24	89,35	99,09
% parasitismo de fêmeas	0	21,80 ± 2,45	48,64 ± 7,96	70,11 ± 9,23	93,15 ± 4,72

* Média de 4 repetições com o erro padrão da média

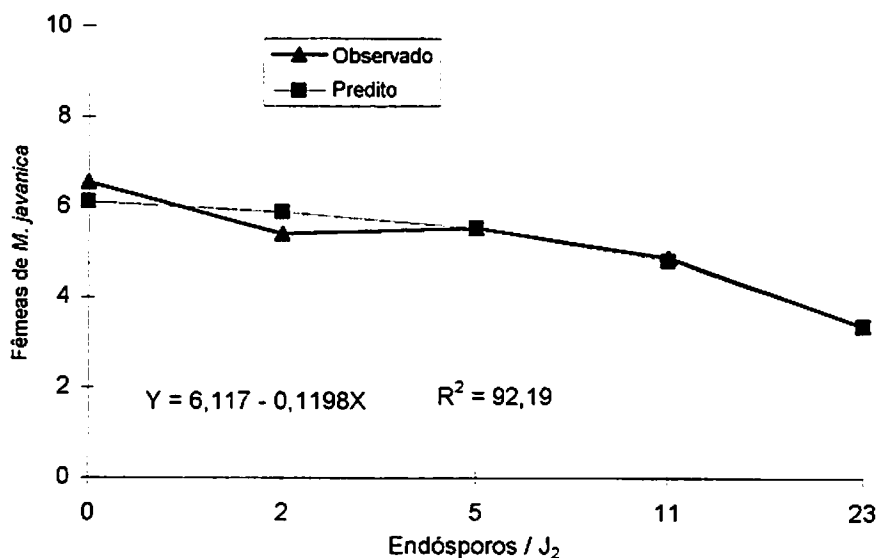


FIGURA 13. Número total de fêmeas de *M. javanica* nas raízes de tomateiros após a inoculação de J₂ com diferentes níveis de inóculo do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. aderidos na cutícula. (Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$). UFLA, Lavras - MG, 1997.

O número total de fêmeas nas raízes correlacionou-se com a percentagem de fêmeas parasitadas ($r=-0,5538$, $p=0,0057$) e com o número de ovos produzidos ($r=0,8109$, $p<0,0001$) e a percentagem de parasitismo correlacionou-se com o número de ovos ($r=-0,9027$, $p<0,0001$).

As equações de regressão apresentaram um bom ajuste, pois além dos altos valores observados para os coeficientes de determinação (R^2), a análise de resíduos revelou que 100 % dos erros padronizados apresentaram-se no intervalo -1,96 e + 1,96 (Neter, Wasserman e Kutner, 1990).

Houve um decréscimo de até 69 % no número total de fêmeas nas raízes (Tabela 7). O aumento do número de endósporos/J₂ provavelmente causou a diminuição do número de fêmeas nas raízes pela diminuição da penetração dos J₂. A diminuição da penetração de J₂ de *Meloidogyne* spp. com endósporos aderidos na cutícula em raízes de plantas hospedeiras foi comprovada por Stirling (1984); Brown e

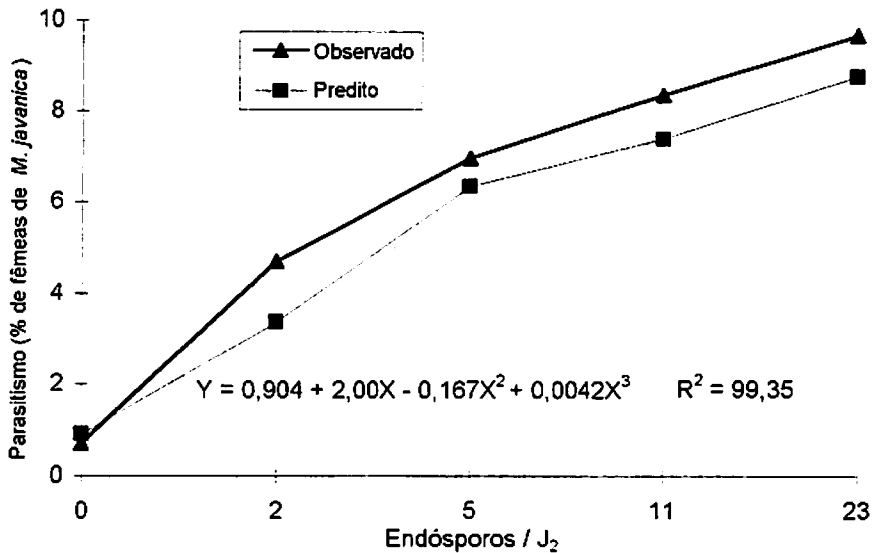


FIGURA 14. Percentagem de fêmeas de *M. javanica* parasitadas após a inoculação de J₂ com diferentes níveis de inóculo do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. aderidos na cutícula. (Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$). UFLA, Lavras - MG, 1997.

Smart Jr. (1985) e Davies, Kerry e Flynn (1988). Talvez as reduções observadas (até 69 % em J₂ com média de 23 endósporos) estejam relacionadas com as baixas densidades de J₂ inoculados (100 J₂/planta). Davies, Kerry e Flynn (1988) demonstraram a ocorrência de maiores reduções na penetração (até 86 %) quando J₂ de *M. incognita* contendo 15 endósporos aderidos na cutícula foram inoculados em raízes de tomateiro em altas densidades (mais de 1000 J₂/planta), não acontecendo o mesmo em inoculações de baixas densidades.

Quanto maior o número de endósporos na cutícula dos J₂, maior o número de fêmeas parasitadas (Tabela 7). Esses resultados assemelham-se aos obtidos por Stirling (1984); Davies, Kerry e Flynn (1988) e Singh e Dhawan (1994). Apesar do alto nível de inóculo na cutícula dos J₂, não ocorreu 100 % de parasitismo nas fêmeas, o que está relacionado com a eficiência da bactéria. Sayre e Wergin (1977) e Stirling (1984) estimaram que apenas 20 a 30 % dos endósporos aderidos na cutícula são capazes de germinar. As razões para esta relativa baixa capacidade germinativa ainda não foram

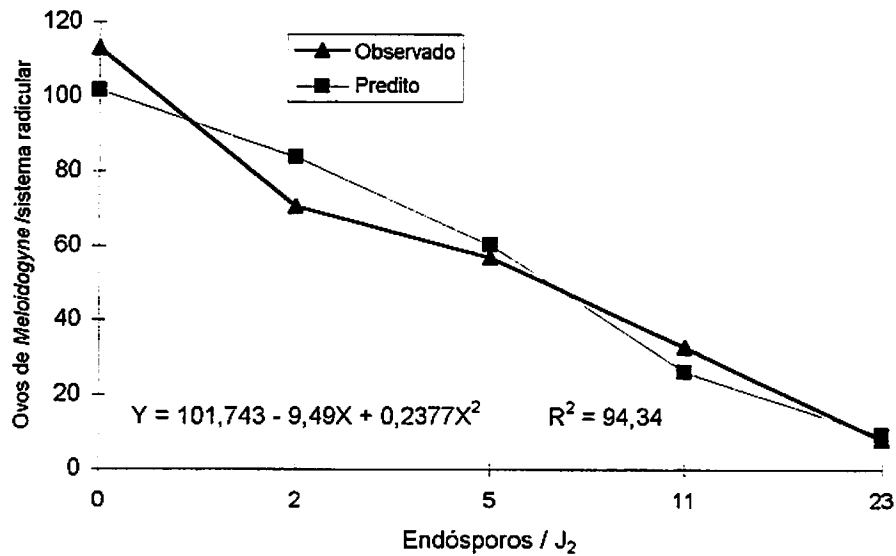


FIGURA 15. Número de ovos produzidos por fêmeas de *M. javanica* no sistema radicular de tomateiros após inoculação de J₂ com diferentes níveis de inóculo de *Pasteuria* sp. aderidos na cutícula. (Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$). UFLA, Lavras - MG, 1997.

elucidadas. Entretanto, Sturham et al. (1994) observaram uma grande proporção de endósporos vazios (incapazes de germinar) aderidos à cutícula de J₂ de *H. goettingiana*. Estes endósporos vazios podem ocorrer em isolados da bactéria parasitas de *Meloidogyne* spp., diminuindo a eficiência de *Pasteuria* como agente biológico de controle. Outros fatores que podem contribuir para diminuir a eficiência de *Pasteuria* são o desprendimento de endósporos da cutícula dos J₂ e a resistência do nematóide ao ataque da bactéria. O desprendimento de endósporos da cutícula é causado pelo contato entre os nematóides e pela movimentação no solo (Ratnasoma, Gowen e Hague, 1991). Resistência de uma população de *M. javanica* e *M. incognita* ao ataque de um isolado de *Pasteuria* foi observada por Tzortzakakis e Gowen (1994), quando a bactéria e o nematóide foram mantidos em contato por mais de 4 gerações. Pode também ocorrer atuação conjunta desses fatores na interação entre *Pasteuria* e o nematóide hospedeiro, reduzindo a eficiência da bactéria. Em termos práticos, pode ser necessária a aplicação de uma maior quantidade de endósporos a nível de campo para o controle do nematóide.

À medida que se aumentou o nível de inóculo na cutícula dos J₂, ocorreu um decréscimo na produção de ovos pelas fêmeas (Tabela 7). Apesar da diminuição drástica na produção de ovos, foram observadas fêmeas com endósporos, porém produzindo alguns ovos, o que pode estar relacionado à resistência parcial do nematóide à bactéria (Tzortzakakis e Gowen, 1994). A quebra dessa resistência pode ser feita pela aplicação de endósporos de populações mistas da bactéria.

A partir da aplicação de isolados agressivos e adaptados ao parasitismo do nematóide hospedeiro, é possível a obtenção de controle do nematóide das galhas. Stirling (1984) observou ausência de galhas em raízes de tomateiros que cresciam em solos tratados com endósporos de *Pasteuria*.

7.4 CONCLUSÕES

O maior nível de inóculo do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. em J₂ (23 endósporos/J₂) causou uma redução de 69 % nas fêmeas nas raízes e 99,09 % na produção de ovos/sistema radicular, ocorrendo uma percentagem média de parasitismo da ordem de 93,15.

A percentagem de parasitismo de *M. javanica* pelo isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. não atingiu 100 %, provavelmente devido à falta de adaptação da bactéria a esta população de *M. javanica*. Sendo portanto, necessária a seleção de um isolado mais eficiente.

7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN, S.M.; SMART Jr., G.C. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.17, n.2, p.123-126, Apr. 1985.
- BROWN, S. M.; KEPNER, J. L.; SMART Jr. , G. C. Increasead crop yields following aplication of *Bacillus penetrans* to field plots infested with *Meloidogyne incognita*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.17, n.4, p.483-486, July/ Aug. 1985.
- ⁶ CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W.; McSORLEY, R.; MITCHELL, D.J.; HEWLETT, T.E. Supression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.28, n.2, p.159-168, June 1996.
- DAVIES, K.G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v.112, n.3, p.491-501, June 1988.
- DUBE, B.N.; SMART JR., G.C. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Pacilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.19, n.2, p.222-227, Apr. 1987.
- DUTKY, E.M.; SAYRE, R.M. Some factors affecting infection of nematodes by bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.10, n.4, p.285, Oct. 1978. (Resumos)
- EPSTEIN, E. **Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas**. Tradução e Notas MALAVOLTA, E. Rio de Janeiro: Livros técnicos e Científicos/São Paulo: Universidade de São Paulo, 1975. 341p.

- HATZ, B.; DICKSON, D.W. Effect of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.24, n.4, p.512-521, Dec. 1992.
- HEWLETT, T.E.; DICKSON, D.W. A centrifugation method for attaching endospores of *Pasteuria* spp. to nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.25, n.4, p.785-788, Dec. 1993. (Suplemento)
- MANKAU, R.; PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.9, n.1, p.40-45, Jan. 1977.
- NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. Diagnostics and remedial measures I. In: _____. **Applied Linear Statistical Models**. Burr Ridge: R.R. Donnelley & Sons Company, 1990. p.113-158.
- OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.23, n.1, p.58-64, Jan. 1991.
- RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R.; HAGUE, N.G.M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.19, n.2, p.225-227, dic. 1991.
- SAYRE, R.M. Promising organisms for biological control of nematodes. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, n.6, p.526-532, June 1980.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.129, n.2, p.1091-1101, 1977.
- SINGH, B.; DHAWAN, S.C. Effect of *Pasteuria penetrans* on the penetration and multiplication of *Heterodera cajani* in *Vigna unguiculata* roots. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.22, n.2, p.159-161, dic. 1994.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.1, p.55-60, Jan. 1984.

STURHAM, D.; WINKELHEIDE, R.; SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Light and electron microscopical studies of the life cycle and developmental stages of *Pasteuria* isolate parasitizing the pea cyst nematode, *Heterodera goettingiana*. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge Cedex, v.17, n.1, p.29-42, jan. 1994.

TZORTZAKAKIS, E.A.; GOWEN, S.R. Resistance of *Meloidogyne* spp. to parasitism by the obligate parasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.40, n.2, p.258-266, Apr. 1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das flutuações populacionais de fitonematóides naturalmente associados com *Pasteuria* spp. revelou uma falta de equilíbrio entre esses organismos nas áreas estudadas. A condição de equilíbrio pode ser estabelecida com o aumento da população de *Pasteuria* nos solos, com o passar do tempo (Stirling e White, 1982). As diferenças encontradas na morfometria dos endósporos de *Pasteuria* associados à diferentes nematóides hospedeiros confirmam a diversidade desta bactéria (Ciancio et al., 1994).

Apenas *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* puderam ser considerados hospedeiros do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp., confirmando a restrita gama de hospedeiros apresentada por populações ou isolados individuais da bactéria (Davies, Kerry e Flynn, 1988). O isolado P1-UFLA apresentou agressividade diferenciada nas populações de *M. incognita* e *M. javanica* testadas. A observação de baixos índices de infestação e parasitismo do isolado P1-UFLA na população mista (*M. incognita* + *M. javanica*), da qual a bactéria foi obtida, confirma a ocorrência de resistência parcial desta população de *Meloidogyne* ao ataque de *Pasteuria* sp. (Tzortzakakis e Gowen, 1994). A mobilidade dos juvenis do segundo estágio (J₂) de *M. javanica* e *M. incognita* não foi afetada pela centrifugação e pela presença de endósporos na cutícula, provavelmente devido ao método empregado neste trabalho. Talvez, devido à força centrífuga empregada, a idade dos J₂ de *M. javanica* não tenha afetado a adesão de endósporos de *Pasteuria* à cutícula dos mesmos. A morte dos J₂ de *M. javanica* e *M. incognita* pelo calor

diminuiu drasticamente o número de endósporos de *Pasteuria* sp. aderidos à cutícula, provavelmente o aquecimento tenha provocado mudanças na cutícula que dificultaram o processo de reconhecimento.

Demonstrou-se que o método da digestão enzimática apresenta maior eficiência para a quantificação de endósporos de *Pasteuria* sp. em raízes de tomateiro, confirmando os resultados obtidos por Sharma e Stirling (1993). Através da análise de curvas-padrão confeccionadas em solo argiloso e areia lavada, comprovou-se a maior disponibilidade de endósporos em areia que em solo argiloso, confirmando os resultados obtidos por Dabiré et al. (1996). A concentração de endósporos em amostras dos solos infestados, onde estudou-se a flutuação populacional de *M. incognita*, *M. javanica* e *Meloidogyne* sp. associados com *Pasteuria* sp., foi considerada insuficiente para suprimir as populações desses nematóides, confirmando a hipótese de falta de equilíbrio nessas áreas.

O isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. não apresentou boa eficiência de controle sobre uma população de *M. javanica*, sugerindo a aplicação de maiores concentrações de endósporos para o controle deste nematóide ou a seleção de isolados mais agressivos. Esses resultados confirmam a baixa agressividade a essa população observada no estudo da gama de hospedeiros do isolado P1-UFLA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CIANCIO, A.; BONSIGNORE, R.; VOVLAS, N.; LAMBERTI, F. Host records and morphometrics of *Pasteuria penetrans* group parasites of nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.63, n.3, p.260-267, May 1994.
- DABIRÉ, K.R.; MATEILLE, T.; DIOP, M.T.; N'DIAYE, S.; DUPONNOIS, R. Influence of the soil on the availability of *Pasteuria penetrans* to parasitize nematodes in the genus *Meloidogyne*. In: INTERNATIONAL NEMATOLOGY CONGRESS, 3, Gosier, 1996. **Proceedings ...** Guadeloupe: Antilles, 1996. p.182.
- DAVIES, K.G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v.112, n.3, p.491-501, June 1988.
- SHARMA, R.D.; STIRLING, G.R. A method for the extraction and quantification of *Pasteuria penetrans* spores in root material. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.1, p.110-111, mar. 1993.
- STIRLING, G.R., WHITE, A.M. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australia vineyards. **Plant Disease**, St. Paul, v.66, n.1, p.52-53, Jan. 1982.
- TZORTZAKAKIS, E.A.; GOWEN, S.R. Resistance of *Meloidogyne* spp. to parasitism by the obligate parasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v.40, n.2, p.258-266, Apr. 1994.

APÊNDICE

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo das flutuações populacionais de *Meloidogyne* spp. associado com *Pasteuria* sp. em microparcelas instaladas em área anexa ao Departamento de Fitopatologia. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fonte de Variação	Quadrados Médios			
	G. L.	J ₂ de <i>Meloidogyne</i> /100 cc	J ₂ de <i>Meloidogyne</i> infestados	Endósporos/J ₂
Meses	11	5522624,42 **	558,03 **	37,17 NS
Regressão	6	8473034,91 **	875,83 **	-----
Desvio	5	1982131,82	176,67	-----
Resíduo	288	298174,23	209,47	33,40
Média Geral		560,81	20,09	5,94
Coef. Variação (%)		109,43	72,04	100,28

** Significativo ao nível de 1 %.

NS - Não significativo até o nível de 10 %.

TABELA 2 A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo das flutuações populacionais de *Tylenchulus semipenetrans* associado com *Pasteuria* sp. em pomar de citros localizado no município de Luminárias - MG. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	Quadrados Médios			
	G. L.	J ₂ <i>Tylenchulus</i> /100 cc	J ₂ <i>Tylenchulus</i> infest./paras.	Endósporos/J ₂
Meses	11	6181,27 NS	148,42 NS	1,67 NS
Resíduo	12	10709,33	278,31	2,32
Média Geral		152,5	22,73	2,94
Coef. Variação (%)		67,86	73,36	51,78

NS - Não significativo até o nível de 10 %.

TABELA 3A. Coeficientes de correlação parcial e a significância dos mesmos, em dados obtidos do estudo das flutuações populacionais de *Meloidogyne* spp. e *Tylenchulus semipenetrans* naturalmente associados com *Pasteuria* spp. respectivamente em microparcelas e em um pomar de citros. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Variáveis	Correlação (r)	Significância
J ₂ M - J ₂ M inf. *	- 0,0691	0,2978
J ₂ M - End./J ₂ M *	0,1042	0,1158
J ₂ M inf. - End./J ₂ M *	0,1369	0,0385
J ₂ T - J ₂ T inf. **	- 0,7873	0,0014
J ₂ T - End./J ₂ T **	- 0,0427	0,8897
J ₂ T inf. - End./J ₂ T **	- 0,0635	0,8367

* Microparcelas ; ** Pomar de Citros

J₂ M - Número de J₂ de *Meloidogyne* spp./100 cc de solo; J₂ M inf. - Percentagem de infestação dos J₂ de *Meloidogyne* spp.; End./J₂ M - Número médio de endósporos/J₂ de *Meloidogyne* spp.; J₂ T - Número de J₂ de *Tylenchulus semipenetrans*/100 cc de solo; J₂ T inf. - Percentagem de infestação e/ou parasitismo dos J₂ de *T. semipenetrans*; End./J₂ T - Número médio de endósporos/J₂ de *T. semipenetrans*.

TABELA 4A. Coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre dados climáticos e fitonematóides associados com *Pasteuria* spp. em microparcelas e em um canteiro plantado com *Heliconia* sp. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Variáveis	T5	UR5	Pac5
1 - Núm. De J ₂ <i>Meloidogyne</i> spp./100 cc de solo	- 0,3047 (0,1678)	0,1927 (0,2742)	0,6157 (0,0165)
2 - Percentagem de J ₂ de <i>Meloidogyne</i> infest.	0,2614 (0,2059)	0,1611 (0,3085)	- 0,3184 (0,1565)
3 - Endósporos/J ₂ de <i>Meloidogyne</i> spp.	0,2614 (0,2059)	0,0212 (0,4740)	- 0,0564 (0,4309)
4 - Número de <i>P. brachyurus</i> /100 cc de solo	0,0029 (0,5000)	0,0856 (0,3957)	0,4512 (0,0705)
5 - Percentagem de <i>P. brachyurus</i> infest./paras.	0,6978 (0,0058)	- 0,4147 (0,0900)	0,3465 (0,1349)
6 - Endósporos/ <i>P. brachyurus</i>	0,2797 (0,1893)	0,2672 (0,2005)	- 0,4352 (0,0787)
7 - Num. De J ₂ <i>Meloidogyne</i> sp./100 cc de solo	0,4629 (0,0649)	- 0,1218 (0,3530)	- 0,1990 (0,2676)
8 - Percentagem de J ₂ de <i>Meloidogyne</i> infest.	- 0,1846 (0,2829)	0,1385 (0,3339)	0,5175 (0,0424)
9 - Endósporos/J ₂ de <i>Meloidogyne</i> sp.	0,3842 (0,3680)	0,3817 (0,2204)	0,1337 (0,3393)

1-6 - Microparcelas (área 1) ; 7-9 - *Heliconia* sp. (área 2) ; T5 - Temperatura média dos 5 dias anteriores a amostragem; UR5 - Umidade relativa média dos 5 dias anteriores a amostragem; Pac5 - Precipitação acumulada dos 5 dias anteriores a amostragem.

Entre parênteses estão as significâncias dos respectivos coeficientes.

TABELA 5A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo sobre a gama de hospedeiros do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	Quadrados Médios		
	G. L.	Endósporos/J ₂	Porcentagem de parasitismo
Tratamentos	9	40,72 **	4289,57 **
Resíduo	30	2,34	46,80
Média Geral		6,64	32,03
Coef. Variação (%)		23,04	9,23

** Significativo ao nível de 1 %.

TABELA 6A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo sobre o efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. sobre a mobilidade de J₂ de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	Quadrados Médios		
	G. L.	<i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i> raça 1
Tratamentos	3	14,58 NS	27,78 NS
Blocos	4	6,93	3,25
Resíduo	12	16,63	31,12
Média Geral		11,55	17,33
Coef. Variação (%)		35,30	20,99

** Significativo ao nível de 1 %.

NS - Não significativo até o nível de 10 %.

TABELA 7A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo sobre o efeito da idade dos J₂ de *Meloidogyne javanica* na adesão de endósporos do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	Quadrados Médios	
	G. L.	Adesão de Endósporos
Tratamentos	4	1,11 NS
Resíduo	20	0,680
Média Geral		7,65
Coef. Variação (%)		10,78

** Significativo ao nível de 1 %.

NS - Não significativo até o nível de 10 %.

TABELA 8A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos na comparação de métodos para a quantificação de endósporos de *Pasteuria* sp. em raízes de tomateiro. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	Quadrados Médios	
	G. L.	Núm. de endósporos/g de raiz
Métodos	2	7293412 **
Resíduo	18	303732
Média Geral		5728,4
Coef. Variação (%)		9,62

** Significativo ao nível de 1 %.

TABELA 9A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos na confecção de curvas-padrão da concentração de endósporos de *Pasteuria* sp. em solo e areia. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	Quadrados Médios					
	G. L.	Endósporos /J ₂ (Solo)	% infestação (Solo)	G. L.	Endósporos /J ₂ (Areia)	% Infestação (Areia)
Tratamentos	7	18,35 **	63,14 **	7	54,76 **	56,45 **
Regressão	2	127,84 **	438,06 **	3	379,34 **	390,29 **
Desvio	5	2,41	3,17	4	2,54	2,73
Resíduo	32	0,46	0,38	32	0,081	0,59
Média Geral		2,33	6,79		4,37	7,92
Coef. Variação (%)		9,17	9,07		6,52	9,72

** Significativo ao nível de 1 %.

TABELA 10A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do estudo do efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica*. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Causas de Variação	G. L.	Quadrados Médios				
		Total de fêmeas	G. L.	Fêmeas parasitadas	G. L.	Número de ovos
Tratamentos	4	5,34 *	4	49,47 **	4	6317,74 **
Regressão	1	19,68 *	3	196,76 **	2	23840,80 **
Desvio	3	1,67	1	1,29	2	1430,15
Blocos	3	10,51	3	1,38	3	1155,21
Resíduo	12	1,32	12	0,42	12	227,85
Média Geral		5,14		6,07		56,20
Coef. Variação (%)		22,36		10,65		26,86

* Significativo ao nível de 5 %.

** Significativo ao nível de 1 %.

TABELA 11A. Coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre os dados referentes ao estudo do efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria* sp. sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica*. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Variáveis	Correlação (r)	Significância
TF - Par.	- 0,5538	0,0057
TF - Ovos	0,8109	0,0000
Par. - Ovos	- 0,9027	0,0000

TF - Número total de fêmeas nas raízes.

Par. - Percentagem de fêmeas parasitadas.

Ovos - Número de ovos produzidos/sistema radicular.