



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**OCORRÊNCIA DE *PASTEURIA NISHIZAWAE* EM ÁREAS DE SOJA E
CONTROLE DE *HETERODERA GLYCINES* EM CASA DE VEGETAÇÃO**

CAMILLA BUIATTI VICENTE

MESTRADO
2014

CAMILLA BUIATTI VICENTE

**OCORRÊNCIA DE *PASTEURIA NISHIZAWAE* EM ÁREAS DE SOJA E
CONTROLE DE *HETERODERA GLYCINES* EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof^a. Dra. Maria Amelia dos Santos

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- V632o
2014 Vicente, Camilla Buiatti, 1986-
Ocorrência de *Pasteuria nishizawae* em áreas de soja e controle de
Heterodera glycines em casa de vegetação / Camilla Buiatti Vicente. --
2014.
49 f. : \b il.
- Orientadora: Maria Amelia dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Agronomia.
Inclui bibliografia.
1. Agronomia - Teses. 2. Soja - Doenças e pragas - Teses. 3. Nematói-
de de cisto da soja - Teses. 4. Pragas - Controle biológico - Teses. I.
Santos, Maria Amelia dos, 1964- II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

CAMILLA BUIATTI VICENTE

**OCORRÊNCIA DE *PASTEURIA NISHIZAWAE* EM ÁREAS DE SOJA E
CONTROLE DE *HETERODERA GLYCINES* EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014.

Prof^a. Dra. Clélia Aparecida Iunes Lapera

UEMG

Prof^o. Dr. Adão de Siqueira Ferreira

UFU

Prof^a. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi

UFU

Prof^a. Dra. Maria Amelia dos Santos
ICIAG-UFU
(Orientadora)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a todos meus professores,
pelo apoio e pela contribuição em minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela minha família que sempre me incentivou e me apoiou em todas as minhas decisões, pessoas que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

À minha mãe Orcilene Buiatti pelo imenso amor, companheirismo, amizade, apoio, incentivo, confiança. A melhor mãe do mundo.

Aos meus avós Jerônimo Buiatti e Angelina Zanatta Buiatti, que hoje moram dentro do meu coração, que sempre me apoiaram e se orgulharam de mim, exemplos de pessoas boas em minha vida.

Ao meu namorado José Antônio de Oliveira Pondeleki pelo amor, incentivo e companheirismo.

Aos meus familiares, tios e primos que participaram das minhas conquistas e compartilharam momentos únicos em minha vida.

Aos meus amigos que conquistei na faculdade, em especial ao Heliomar e Ivaniele que me incentivaram e apoiaram a seguir este caminho, esta conquista também é de vocês, e todos os outros com os quais compartilhei muitos momentos inesquecíveis.

À todos os professores e técnicos do Instituto de Ciências Agrárias que compartilharam e acompanharam a minha trajetória acadêmica.

Ao técnico do Laboratório de Nematologia, Aires Ney Gonçalves de Souza, pela paciência, por compartilhar comigo todo o seu conhecimento e por sempre estar disposto a ajudar.

Ao Laboratório de Nematologia (LANEM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), por possibilitar o meu aprendizado.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho.

À Estação Experimental da Syngenta de Uberlândia, setor Lab Services, que possibilitou a montagem e realização dos ensaios dessa dissertação.

Aos meus colegas de trabalho da Syngenta, que estiveram ao meu lado durante este período da minha vida, no qual eu me dividia entre os estudos e o trabalho.

Em especial à minha orientadora Prof^ª. Dra. Maria Amelia dos Santos pelas conversas, conselhos, confiança, por compartilhar comigo seu conhecimento. Tenho uma grande admiração por ela, pessoal e profissional.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”

José de Alencar

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1 Cultura da soja no Brasil	04
2.2 Produção mundial e brasileira da soja	05
2.3 Nematóide do cisto da soja – <i>Heterodera glycines</i>	06
2.4 Controle biológico	08
2.5 <i>Pasteuria</i> spp.	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Ocorrência natural de <i>P. nishizawae</i> em áreas agrícolas com cultivo de soja	15
3.2 Infectividade de <i>Heterodera glycines</i> em cultivares de soja resistente e suscetível	16
3.2.1 1º Ensaio: Comparação da infectividade entre cultivares resistente e suscetível	16
3.2.2 2º Ensaio: Efeito do tratamento de sementes sobre a cultivar suscetível	17
3.3 Eficiência de doses crescentes do produto à base de <i>Pasteuria nishizawae</i> no controle de <i>H. glycines</i>	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Ocorrência natural de <i>P. nishizawae</i> em áreas agrícolas com cultivo de soja	19
4.2 Infectividade de <i>Heterodera glycines</i> em cultivares de soja resistente e suscetível	20
4.2.1 1º Ensaio: Comparação da infectividade entre cultivares resistente e suscetível	20
4.2.2 2º Ensaio: Efeito do tratamento de sementes sobre a cultivar suscetível	22

4.3 Eficiência de doses crescentes do produto à base de <i>Pasteuria nishizawae</i> no controle de <i>Heterodera glycines</i>	24
5. CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICES	37

RESUMO

VICENTE, Camilla Buiatti. **Ocorrência de *Pasteuria nishizawae* em áreas de soja e controle de *Heterodera glycines* em casa de vegetação.** 2014. 49f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG, Brasil.¹

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura de grande importância econômica. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial. Um dos mais sérios problemas fitossanitários desta cultura é o nematoide do cisto, *Heterodera glycines* (Ichinohe), considerado o parasito mais destrutivo. A primeira ocorrência desta doença no Brasil foi relatada na safra 1991/1992. O controle de nematoides é mais difícil quando comparado com outros patógenos. Torna-se cada vez mais importante a busca de efetivo controle alternativo, que não ofereça risco ao meio ambiente e nem ao aplicador. Sendo assim, a bactéria *Pasteuria* spp. representa um promissor agente de controle biológico dos nematoides, apresentando alta especificidade. O controle biológico do nematoide do cisto da soja pela bactéria *Pasteuria nishizawae* têm se mostrado uma excelente opção e vem sendo estudada por diversos pesquisadores. Os objetivos deste trabalho foram determinar a ocorrência natural de *Pasteuria nishizawae* em solos brasileiros, além da comparação de infectividade entre cultivares de soja resistente (P98Y12) e suscetível (cultivar experimental) ao nematoide de cisto, avaliando-se, também, a eficiência de um produto a base de *Pasteuria nishizawae* no controle de *Heterodera glycines*. Os ensaios foram conduzidos em casa-de-vegetação na Unidade de Pesquisa da Syngenta em Uberlândia – MG, bem como no Laboratório de Nematologia da mesma Instituição. Nos ensaios, avaliações ocorreram quanto à frequência da bactéria encontrada naturalmente nos solos, além da quantificação do número de juvenis penetrados por sistema radicular, contagem do número de cistos e ovos por cisto. Entre as cultivares de soja resistente e suscetível, houve diferença na taxa de penetração de juvenis, sendo maior na cultivar suscetível. Para a cultivar suscetível, os índices de fêmeas encontrados foram menores no tratamento com o produto biológico. Conforme se aumentou as doses de *Pasteuria nishizawae*, houve redução da penetração de juvenis nas raízes e número de cistos formados.

Palavras-chave: bactéria, controle biológico, nematoide de cisto, *Glycine max*.

¹ Comitê Orientador: Maria Amelia dos Santos – UFU (Orientadora)

ABSTRACT

VICENTE, Camilla Buiatti. **Occurrence of *Pasteuria nishizawae* in soybean areas and *Heterodera glycines* control in the greenhouse.** 2014. 49f. Dissertation (Master's Program Agronomy/Phytopathology) - Federal University of Uberlândia – Uberlândia, MG, Brazil.¹

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is a crop of great economic importance. Brazil is the second largest producer and exporter. One of the most serious disease problems of this culture is the cyst nematode *Heterodera glycines* (Ichinohe), considered as its most destructive parasite. The first occurrence of this disease in Brazil was reported in the 1991/1992 harvest. Nematode control is more difficult than that of other pathogens. Therefore, it becomes increasingly important to search for effective alternative control methods, reducing contamination risks to the environment and to the applicator. Thus, the bacterium *Pasteuria* spp. represents a promising, highly specific, agent for biological control of nematodes. The biological control of soybean cyst nematode by the bacterium *Pasteuria nishizawae* has proven an excellent choice and is being studied by many researchers. The objectives of this study were to determine the natural occurrence of *Pasteuria nishizawae* in Brazilian soils and compare infectivity in resistant soybean (P98Y12) and susceptible (experimental) cultivars, determining the efficiency of a product based on *Pasteuria nishizawae* in the control of *Heterodera glycines*. The tests were conducted in a greenhouse in Syngenta Research Unit in Uberlândia - MG, as well as in the Nematology Laboratory of the same Institution. Evaluations of field trials consisted of quantification of naturally occurring bacterium in soils, of the number of juveniles penetrated in each root system, of the number of cysts and of the number of eggs per cyst. Significant differences were observed in juvenile penetration rate between the resistant and susceptible soybean cultivars, which was greater in the susceptible one. Female indices were smaller in the susceptible cultivar after treatment with biological product. As *Pasteuria nishizawae* doses increased, juvenile penetration in roots and number of cysts formed decreased.

Keywords: bacteria, biological control, cyst nematode, *Glycine max*.

¹ Supervisor: Maria Amelia dos Santos – UFU (Major Professor)

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura de grande importância econômica. É a espécie oleaginosa mais cultivada no mundo, com produção no ano agrícola 2010/2011 de 251,29 milhões de toneladas (ESTADOS UNIDOS, 2013). O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial, com área cultivada de aproximadamente 26,4 a 27,3 milhões de hectares e produção ao redor de 80,08 a 82,99 milhões de toneladas de grãos na safra 2012/2013 (COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO, 2013), o que correspondeu a 27% da produção mundial. Segundo divulgação da CONAB (2013), a área ocupada pela oleaginosa avançou mais 297,8 mil hectares (1,1%) e ampliou o aumento em relação à safra passada em 2,603 milhões de hectares (10,4%).

Um dos mais sérios problemas fitossanitários da cultura da soja é o nematoide do cisto, *Heterodera glycines* Ichinohe, considerado o parasito mais destrutivo entre os que atacam esta cultura (NOEL, 1992). Este nematoide infesta às áreas de soja, causando redução na produção do mundo todo. Muitas perdas de rendimento são observadas em áreas altamente infestadas com *Heterodera glycines*, podendo ocorrer destruição completa da lavoura (AGRIOS, 1988).

O nematoide de cisto da soja atualmente ocorre em mais de 3 milhões de hectares cultivados com a cultura, causando reboleiras de plantas amareladas e subdesenvolvidas. Está presente nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Tocantins. Em solos arenosos, esse nematoide pode causar perdas de 10% a 30% quando em baixas infestações, podendo chegar a 70% ou mais quando há grande incidência (INOMOTO, 2006).

Os métodos mais utilizados para controlar os fitonematoides têm sido o uso de nematicidas, variedades resistentes além da rotação de culturas. Os nematicidas, além de caros, podem ser prejudiciais ao ambiente, à saúde humana, à vida selvagem e aos organismos benéficos do solo. O uso de variedades resistentes é uma maneira natural e altamente recomendável de controlar pragas e doenças. Contudo, no caso específico desse nematoide, são poucas as variedades resistentes disponíveis para o agricultor em função do grande número de raças ou tipos HG que ocorrem no Brasil (FERRAZ; FREITAS, 2004).

Algumas práticas culturais, como a rotação de culturas, podem ser usadas, efetivamente, resultando em maiores produções e renda para o agricultor, sem agredir o meio ambiente. O uso de plantas antagonistas em esquemas de rotação ou plantio consorciado têm se mostrado uma alternativa bastante atrativa. Algumas dessas plantas são capazes de fixar nitrogênio da atmosfera, fornecem expressivos volumes de matéria orgânica, aumentando a atividade de fungos antagonistas e melhorando as características gerais do solo. Substâncias químicas com efeito nematicida têm sido isoladas de algumas dessas plantas (FERRAZ; FREITAS, 2004).

Em países com clima tropical e subtropical, os nematoides encontram condições de umidade e temperatura ideais para reprodução e alimentação. Tais fatores são agravantes no controle destes patógenos, os quais após terem se estabelecido em uma área são de erradicação muito difícil. No Brasil, as espécies que causam os maiores danos às grandes culturas como soja, algodão, cana-de-açúcar e milho são *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Stekhoven, *Pratylenchus zaeae* Graham e *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira (TORRES et al., 2008).

Métodos culturais, como a rotação de culturas com espécies não hospedeiras e/ou antagonistas, têm sido efetivas práticas de manejo de nematoides (COSTA; FERRAZ, 1990; SANTOS; RUANO, 1987). Alguns trabalhos, também, mostram que o cultivo de plantas não hospedeiras apenas na entressafra não proporcionou redução da população de nematoides e que apenas a semeadura de cultivares resistentes, como única opção, não controla os nematoides.

Com isso, há necessidade da adoção de um conjunto de boas práticas agronômicas que irá manter as populações dos nematoides abaixo do limiar de dano econômico, elevando a produtividade da cultura sem oferecer riscos ao meio ambiente, promovendo no campo uma relação de convivência com estes patógenos (TORRES et al., 2008).

O controle biológico de nematoides pode ser realizado por fungos nematófagos, estes apresentam a capacidade de capturar, matar e digerir os nematoides. Eles compreendem três grupos distintos: endoparasitas, predadores e parasitas de ovos. Por serem muito dependentes de água, os fungos endoparasitos têm pequeno potencial de uso prático (NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLID, 2002).

Os predadores, pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys* Corda e *Monacrosporium* Subramaniam, capturam os estádios vermiformes dos nematoides através de estruturas especializadas. Por outro lado, *Purpuricillium lilacinum* (Thomn.) Samson e *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams, conhecidos anteriormente como *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* Goddard, respectivamente, parasitam ovos e fêmeas, colonizando-os e consumindo-os completamente (NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLID, 2002). Os fungos predadores e os parasitas de ovos são certamente os grupos mais estudados e que apresentam o maior potencial de biocontrole (JATALA, 1986; NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLID, 2002).

Inúmeros micro-organismos do solo são conhecidos como parasitas ou predadores de fitonematoídeos (SHARMA; VIVALDI, 1999) a ação desses pode ser resultante de efeito direto ou indireto através da interferência em etapas do ciclo vital do patógeno. As bactérias do gênero *Bacillus* Cohn, principalmente *B. subtilis* Cohn, além de componentes da população microbiana do solo, rizoplano e filoplano, apresentam características atrativas para os estudos de controle biológico de doenças de plantas (NORONHA; MICHEREFF; MARIANO, 1995).

Portanto, os objetivos desse trabalho foram: determinar a ocorrência natural de *Pasteuria nishizawae* Sayre em áreas de cultivo de soja; comparar a infectividade entre cultivares de soja resistente e suscetível ao nematoídeo do cisto; e avaliar a eficiência de um produto à base de *Pasteuria nishizawae* no controle de *Heterodera glycines* em casa de vegetação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura da soja no Brasil

A soja é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são muito utilizados pela agroindústria, na produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal, além da presença na indústria química e de alimentos. O seu uso vem crescendo como fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO; ROSSI, 2000).

O centro de origem e domesticação da soja é o nordeste da Ásia (China e regiões adjacentes) e a sua disseminação do Oriente para o Ocidente ocorreu pelas navegações (CHUNG; SINGH, 2008).

No Brasil, o primeiro relato do cultivo de soja é de 1882, no estado da Bahia (BLACK, 2000). Em seguida, foi levada por imigrantes japoneses para São Paulo. Em 1891, testes de adaptação de cultivares foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas, estado de São Paulo (SP). Assim como nos Estados Unidos da América, a soja no Brasil dessa época era estudada mais como cultura forrageira. Somente em 1900 e 1901 o Instituto Agrônomo de Campinas, SP, promoveu a primeira distribuição de sementes de soja para produtores paulistas (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2004).

Em 1914, a soja foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul, sendo este, por fim, o lugar onde as variedades trazidas dos Estados Unidos, adaptaram-se bem às condições climáticas predominantes no extremo sul do Brasil, principalmente em relação ao fotoperíodo (BONETTI, 1981).

Os fatores que contribuíram para que a soja se tornasse uma importante cultura foram: semelhança do ecossistema do sul do Brasil com aquele predominante no sul dos EUA; investimento na correção e fertilidade do solo; incentivos fiscais disponibilizados pelo governo para compra de máquinas e implementos agrícolas; mercado internacional em expansão; substituição das gorduras animais por óleos vegetais mais saudáveis aos seres humanos e melhoria dos sistemas de transportes (EMBRAPA, 2004).

Apesar de tudo, dentre os grandes produtores mundiais (Estados Unidos o maior produtor, Brasil na segunda posição e em terceiro a Argentina), o Brasil apresenta a maior capacidade de multiplicar a atual produção, tanto pelo aumento da produtividade, quanto pelo potencial de expansão da área cultivada. Até 2020, a produção brasileira

deve ultrapassar a barreira dos 100 milhões de toneladas, podendo assumir a liderança mundial na produção do grão (VENCATO et al., 2010).

2.2 Produção mundial e brasileira da soja

Entre as safras de 1987/1988 e 2009/2010, enquanto a área cultivada cresceu 88,6%, a produção mundial foi ampliada em 150,7%. Nesse período, a área passou de 54 milhões de hectares para aproximadamente 102 milhões de hectares na safra 2009/10, já a produção mundial que em 1987/88 era de 103,67 milhões, na safra 2009/10 atingiu a marca de 259,89 milhões de toneladas (LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

Segundo os autores Lazzarotto e Hirakuri (2010), o grande incremento na produção mundial de soja pode ser atribuído a diversos fatores, dentre os quais merecem destaque: elevado teor de óleo (ao redor de 20%) e proteínas (em torno de 40%) de excelentes qualidades encontradas no grão. A soja é uma *commodity* padronizada e uniforme, podendo, portanto, ser produzida e negociada por produtores de diversos países, apresentando alta liquidez e demanda. Nas últimas décadas, houve expressivo aumento da oferta de tecnologias de produção, que permitiram ampliar significativamente a área cultivada e a produtividade da oleaginosa.

No Brasil, a produtividade média das lavouras passou de 1.369,4kg. ha⁻¹ na safra 1985/86 para 2.927,0kg. ha⁻¹ na safra 2009/10, correspondendo a um aumento de 114,77%. No mesmo período, a área cultivada evoluiu de 9,6 milhões para 23,6 milhões hectares, o que representou um crescimento de 145,83% (LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

Esse aumento na produtividade pode ser devido a vários fatores tais como avanços científicos significativos em tecnologias para manejo de solos, com técnicas de correção da acidez, processo de inoculação das sementes para fixação biológica do nitrogênio e adubação balanceada com macronutrientes e micronutrientes. Esses procedimentos permitiram a expressão de potencialidade da cultura nas diversas condições edafoclimáticas do território brasileiro, manejo integrado de pragas e doenças, modernização e aperfeiçoamento nas técnicas de cultivo.

Além disso, a adoção de biotecnologia com sementes transgênicas de soja resistente ao herbicida Roundup Ready (RR), da Monsanto, já atinge mais de 70% da área cultivada com soja no Brasil (VENCATO et al., 2010).

2.3 Nematoide do cisto da soja - *Heterodera glycines*

No mundo foram determinados, aproximadamente, 125 organismos patogênicos à cultura da soja, dos quais cerca de 40 foram considerados de importância econômica.

No Brasil foram encontrados 25 patógenos capazes de provocar danos econômicos. Estes podem ocorrer em diferentes níveis populacionais, que oscilam de safra a safra (DHINGRA; MENDONÇA; MACEDO, 2009). As doenças provocam reduções anuais estimadas em, aproximadamente, 15% a 20% da produção, ao passo que algumas podem ocasionar até 100% (EMBRAPA, 2008).

Dentre os principais patógenos causadores de doenças da soja estão os fitonematoídes, animais que infectam o sistema radicular da planta, diminuindo potencialmente sua produção. Entre os mais importantes na cultura da soja, destacam-se o nematoide do cisto da soja (*Heterodera glycines*) e os nematoídes das galhas (*Meloidogyne javanica* e *M. incognita*) (DHINGRA; MENDONÇA; MACEDO, 2009). Além desses, outros nematoídes de importância na soja são o *Meloidogyne arenaria* Chitwood, o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) e nematoide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*) (EMBRAPA, 2008).

O nematoide do cisto da soja (*H. glycines*) pertencente à ordem Tylenchida, família Heteroderidae (WRATHER; ANAND; DROPKIN, 1984), foi observado pela primeira vez no Japão, em 1915, cuja doença foi nomeada de “nanico amarelo” (DHINGRA; MENDONÇA; MACEDO, 2009). Entretanto, alguns autores denominaram-na de “nanismo amarelo da soja”. Em 1954, foi detectado nos Estados Unidos da América e, em 1983, na Colômbia (GOLDEN; MEDINA, 1983).

Dessa forma, o nematoide do cisto da soja é um parasita obrigatório, que se reproduz por fecundação cruzada e estabelece com a planta uma relação de endoparasito sedentário. O ciclo de vida desse nematoide pode ter duração de aproximadamente 3 semanas, produzindo de cinco a seis gerações do nematoide durante a safra de soja (YOUNG, 1992).

O segundo estágio juvenil (J2) é a forma infectiva. O juvenil penetra na raiz e migra até uma região próxima do cilindro vascular, realizando as transformações nas células vegetais para que se forme a estrutura de alimentação dos nematoídes (ENDO, 1992).

Quando a fêmea é fecundada, apenas 20-30% dos ovos ficam na matriz gelatinosa e o restante é retido no interior do corpo. Logo após a produção dos ovos, a

parede do corpo torna-se coriáceo e a fêmea morre. Cada cisto poderá conter em média 300 ovos, estes entram em diapausa natural. Os juvenis de 2º estágio não eclodem bem nos meses de março a agosto nos locais onde as temperaturas são baixas no inverno. Alguns fatores podem interferir no seu ciclo de vida, tais como temperaturas abaixo de 10°C e baixa umidade do solo (< 40% da capacidade de campo). Tem preferência por solos arenosos, temperaturas em torno de 20 a 30°C e umidade do solo entre 40 e 60% da capacidade de campo. O pH do solo não deve ser elevado, pois nessa condição a população do NCS sempre permanece mais alta e os danos às plantas são maiores (GARCIA et al., 1999).

O NCS penetra nas raízes da planta dificultando a absorção de água e nutrientes, resultando em porte reduzido das plantas e clorose na parte aérea, por isso a doença é conhecida como nanismo amarelo da soja. Os sintomas aparecem em reboleiras, geralmente próximas de estradas ou carregadores (DIAS et al., 2010). Porém, nem toda reboleira está relacionada à presença do nematoide na área, necessitando-se, assim da realização de análises nematológicas em épocas adequadas e buscando sempre a representatividade da área.

As plantas morrem com 30 a 40 dias após a emergência, quando há alta população do nematoide no solo e as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento do mesmo. Em lavouras de soja, cuja área cultivada apresenta baixa população de nematoides, pode haver ausência de sintomas. Portanto, indicações na parte aérea não são diagnósticos precisos (DRINGHA et al., 2009).

Há uma elevada diversidade genética para este nematoide, o que ocorre sob pressão de seleção, favorecendo a ocorrência de novas raças através da reprodução por anfimixia e diferenciadas pelas cultivares de soja que esse nematoide infecta. No Brasil, já foram encontradas 11 raças do NCS (1, 2, 3, 4, 4⁺, 5, 6, 9, 10, 14 e 14⁺) (EMBRAPA, 2008). Com o objetivo de identificar as raças, utilizam-se as hospedeiras de soja diferenciadoras: Peking, Pickett, PI88788, PI90763. A cultivar de soja Lee é suscetível a todas as raças, sendo o padrão de suscetibilidade usado no teste (RIGGS & SCHMITT, 1988).

A disseminação de *Heterodera glycines* pode ser ativada pelo seu próprio esforço ou passiva com ajuda do vento, água, maquinários, movimentação do solo, sementes, sapatos, sacaria e aves migradoras.

O cisto, principal forma de dispersão, por carregar ovos férteis no seu interior, ao completar o seu ciclo de vida desprendem-se do sistema radicular e permanecem no

solo. Assim, qualquer forma de movimentação do solo pode contribuir para carregá-los para áreas isentas do patógeno (SILVA, 1998; FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2004; EMBRAPA, 2008).

Como medidas de controle pode-se optar pelo método da exclusão, adotando-se ações quarentenárias, bem como através da utilização de variedades resistentes.

Das opções de controle encontradas as mais eficientes são a rotação de culturas e a associação de rotação de culturas ao sistema de plantio direto, com a utilização de variedades resistentes, plantas não hospedeiras ou antagonistas.

2.4 Controle biológico

Uma alternativa aos tradicionais métodos de controle de nematoides é o biológico. É um princípio da natureza, em que as populações dos seres vivos são reguladas por outros seres vivos: os agentes de controle biológico. As pesquisas neste campo estão bastante avançadas em algumas instituições, encontrando-se, porém, de forma ainda principiante, alguns produtos comerciais destinados à horticultura. Os principais organismos para esse fim são os fungos e as bactérias. Eles apresentam segurança no manuseio e ao meio ambiente, pois só atuam sobre os nematoides.

Os bionematicidas ou nematicidas microbiológicos são usados como um nematicida tradicional. Eles são aplicados, normalmente no solo, e o princípio ativo, ou seja, o fungo ou a bactéria ao entrar em contato com o nematoide pode levá-lo à morte.

Da mesma forma que os outros métodos tradicionais, em locais com altas infestações a utilização dos bionematicidas pode não ser prontamente eficaz. Os produtos disponíveis apresentam em sua composição fungos dos gêneros *Paecilomyces*, *Arthrobotrys* e rizobactérias. Os dois primeiros foram muito estudados e atuam sobre ovos e juvenis do nematoide, respectivamente. As rizobactérias são organismos que podem atuar diretamente sobre os nematoides por meio de toxinas e antibióticos que inibem a eclosão e a mobilidade dos juvenis, reduzindo a invasão dos nematoides nas raízes das plantas e, indiretamente, pelo desencadeamento de reações na planta que impedem a formação das células gigantes ou acarretam modificações dos exsudatos radiculares, fazendo com que eles não sejam reconhecidos pelos nematoides e deixem de estimular a eclosão, o movimento e a penetração nas raízes (OOSTENDORP & SIKORA, 1990; KERRY, 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001).

Aliada ao fato de não ser tóxico nem ao ambiente, muito menos à saúde humana, há a vantagem do preço. Atualmente, o tratamento do solo com os bionemáticos disponíveis no mercado é 17 a 40% mais barato do que o químico tradicional.

O potencial antagônico de bactérias foi estudado em vários trabalhos de controle biológico de doenças em plantas (BETTIOL; KIMATI, 1990; KREBS et al., 1993; SHARMA; GOMES, 1999). Micro-organismos rizosféricos, principalmente do gênero *Bacillus*, possuem um grande potencial de controle biológico de nematoides fitopatogênicos. Neipp e Becker (1999), avaliando a atividade biocontroladora de isolados de rizobactérias sobre *Heterodera schachtii* Schmidt, encontraram estirpes de bactérias, incluindo *Bacillus megaterium* De Bary, que reduziam a infecção de nematoides em beterraba.

Kloepper et al. (1992) isolaram bactérias da rizosfera de plantas antagonistas à nematoides e encontraram espécies que exibiam um antagonismo a *Heterodera glycines* e *Meloidogyne incognita* em soja, com predominância de isolados do gênero *Bacillus*. Outros estudos evidenciaram o uso de bactérias como biocontroladoras de *Heterodera glycines* em soja (TIAN; RIGGS; CRIPPEN, 2000). Siddiqui e Mahmood (1995) concluíram que a aplicação de três micro-organismos *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) e *Glomus fasciculatum* (Thaxt) Gerd & Trappe emend Walker & Koske resultou em aumento da nodulação em feijão-guandu (*Cajanus cajan*) (L.) Hunth e redução da multiplicação do nematoide *Heterodera cajani* Koshi.

Os primeiros experimentos para o controle de nematoides utilizando fungos nematófagos foram realizados no Havaí, por Linford e Yap (1939). Os pesquisadores testaram a eficiência de *A. oligospora* Fresenius, *M. ellipsosporum* (Preuss) Cooke & Dickinson, *A. musiformis* Drechsler, *Dactylaria candida* (Nees ex Peers.) Saccardo e *M. thaumasium* (Drechsler) Schenck, Kendrick & Pramer, no controle de *Meloidogyne* spp. em plantas de abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merr.].

Desde então, vários estudos têm demonstrado o potencial destes organismos como agentes biocontroladores de nematoides (MANKAU, 1980; JATALA, 1986; STIRLING, 1991; FERRAZ; SANTOS, 1995; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1996), seja envolvendo a aplicação de fungos predadores (DALLA PRIA, 1992; NAVES; CAMPOS, 1993; DIAS; FERRAZ, 1994; ROBINSON; JAFFEE, 1996; STIRLING; SMITH, 1998; OLIVEIRA; FERRAZ; DIAS-ARIEIRA, 2002; SOARES et al., 2005), bem como utilizando *Pochonia chlamydosporia* que é um fungo parasito de ovos e de

fêmeas (DE LEIJ et al., 1993; STIRLING; SMITH, 1998; ATKINS et al., 2003; VERDEJO-LUCAS et al., 2003; HIDALGO et al., 2005).

2.5 *Pasteuria* spp.

Bactérias do gênero *Pasteuria* Metchnikoff são gram-positivas, formadoras de endósporos e micélio. São parasitas obrigatórias e tem como hospedeiros apenas organismos invertebrados (MANKAU, 1975).

A primeira observação de *Pasteuria* em nematoide parasito de planta *Pratylenchus pratensis* de Man foi feita por Thorne em 1940, a qual classificou como protozoário e nomeou como *Dubosquia penetrans*. No entanto, estudos feitos por Mankau (1975) reclassificou como um procarioto do gênero *Bacillus*. A redescoberta de *Pasteuria ramosa* por Sayre, Wergin e Davis (1977) e suas similaridades morfológicas com *Bacillus penetrans* Mankau sugeriram que estas duas bactérias tivessem um relacionamento genérico em comum. Em 1985, Sayre e Starr designaram o organismo que parasitava *Meloidogyne incognita* como *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr.

Micoletzky (1925) sugeriu a sua localização no gênero *Duboscqia*. Foi até meados dos anos 70, quando este organismo foi examinado por microscopia eletrônica e reconhecida como uma bactéria, não um protozoário, e foi nomeado *Bacillus penetrans* Mankau (1975). No entanto, *B. penetrans* não foi reconhecido na lista de aprovados de bactérias. Mais tarde, ela foi renomeada a *Pasteuria*, devido a sua semelhança com *Pasteuria ramosa* Metchnikoff actinomiceto, parasita de *Daphnia magna* Straus.

Atualmente, a taxonomia dentro do gênero *Pasteuria* é principalmente com base nas características morfológicas e patológicas, incluindo o tamanho e a forma dos esporângios e endósporos, suas estruturas moleculares, ciclo de vida e gama de hospedeiros.

Charles et al. (2005) sequenciaram o genoma de *P. penetrans*, analisando o nível de aminoácidos, usando a comparação de genes conservados e identificados 40 *P. penetrans* como ancestral de *Bacillus* spp. Davies (2005) observou uma colinearidade genômica significativa entre *B. subtilis* e *Bacillus penetrans* com longa sequência contígua em um gene. O resultado sugere que as bactérias podem ter evoluído de bactérias ancestrais simbióticas associadas com nematoides, possivelmente quando estes evoluíram para altamente especializado como parasitas de plantas.

A espécie de *Pasteuria* mais estudada até agora pelo seu potencial como um agente de controle biológico foi *P. penetrans*. No entanto, a sua incapacidade para ser maciçamente reproduzidas *in vitro* tem dificultado o seu desenvolvimento como um produto comercial. No entanto, para a introdução no ambiente do solo em microparcelas e estudos de campo, utilizaram-se o pó de raízes secas infectadas com as bactérias, como proposto por Stirling e Wachtel (1980).

A sua utilização, também, tem sido limitada pela especificidade dos isolados para espécies e populações de *Meloidogyne*. Alguns isolados de *P. penetrans* irão aderir a uma espécie particular de nematoide formador de galhas, enquanto outros são compatíveis com outras espécies ou populações da mesma espécie dentro do mesmo gênero dos nematoides. É por isso que vários estudos têm sido destinados a elucidar a natureza da especificidade de hospedeiros de isolados de *P. penetrans*, de modo a melhorar a capacidade das bactérias para utilização como um agente de controle biológico.

De acordo com Tzortzakakis e Gowen (1994), um número elevado de endósporos aderidos aos J2 não garante a redução do número de ovos produzidos, caso ocorra alta variância em adesão e infectividade dos endósporos. Estes permanecem viáveis no solo por muitos anos, são resistentes à dessecação (STIRLING, 1984) e relativamente resistentes às altas temperaturas.

A bactéria além de ser um parasita obrigatório de nematoides, também, apresenta uma interação específica, ou seja, a *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr é um parasita obrigatório do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp. Goeldi), assim como a *Pasteuria nishizawae* é específica do nematoide do cisto (*Heterodera glycines*). A *Pasteuria thornei* Sayre & Starr é específica do nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) (STIRLING; WACHTEL, 1980) enquanto que *Pasteuria usgae* é específica do nematoide *Belonolaimus longicaudatus* Rau (Giblin-Davis et al. 2003).

Para ocorrer o parasitismo é necessária a adesão dos esporos da *Pasteuria* à cutícula dos juvenis de segundo estágio (J2) que a princípio podem impedir a penetração dos juvenis nas raízes. Os esporos desta bactéria são muito resistentes às intempéries e persistem por anos no solo. Entretanto, sua produção por cultivo *in vitro* apresenta dificuldades (WILLIAMS et al., 1989) e a produção de inóculo por muito tempo requereu seu cultivo, *in vivo*, em nematoides parasitando plantas em vasos (STIRLING; WACHTEL, 1980).

Em sucessivas análises microscópicas dos estágios do nematoide *Heterodera glycines* infectado com *Pasteuria nishizawae*, Atibalentja, Noel e Ciancio (2004), observaram que os endósporos que aderem à cutícula dos J2 no solo, não germinam até que o nematoide penetre no sistema radicular da soja.

Simultaneamente à infecção do nematoide na planta, tubos germinativos do endósporo se diferenciam e penetram no corpo do nematoide. Após a germinação, microcolônias primárias parecidas com “couve-flor” se desenvolvem no final do segundo estágio do juvenil ou no início do terceiro estágio do juvenil.

Subsequentemente, as primeiras colônias se fragmentam em numerosas microcolônias secundárias as quais proliferam através da cavidade do corpo das fêmeas dos juvenis do quarto estágio (J4). A primeira evidência da esporulação aparece na forma de “cachos de uva” de esporângios imaturos no J4 e nas fêmeas jovens. Então, fêmeas e cistos infectados apresentam misturas de células de diferentes estágios de desenvolvimento da *Pasteuria*, incluindo esporângios imaturos, octetos, quartetos, triplos, duplos e esporângios individuais. Fêmeas e cistos parasitados são envoltos, principalmente, com esporângios e endósporos maduros, os quais são liberados no solo depois da desintegração do nematoide.

O ciclo de vida da *P. nishizawae* completa-se apenas no pseudoceloma de fêmeas de *H. glycines*, mas raramente ocorre a adesão em machos (SAYRE et al., 1991). Atibalentja, Noel e Ciancio (2004) também não observaram machos em J4 e nem machos adultos sendo infectados por essa bactéria.

Até algum tempo atrás, todos os trabalhos realizados para determinação da diferença de concentração dos endósporos de *Pasteuria* spp. aderidos à cutícula dos juvenis recorriam a hipótese de obtenção *in vivo* dos mesmos, visto que, por ser um parasita obrigatório, não seria possível a multiplicação da bactéria na ausência do organismo hospedeiro.

Sendo assim, sem a possibilidade de sua produção em meio de cultura, o uso como nematicida biológico era limitante, mas a associação deste organismo no manejo integrado de nematoides faz com que sua ação se potencialize com o tempo, até que o solo se torne supressivo.

A Empresa norte-americana *Pasteuria Bioscience*, recentemente adquirida pela Syngenta, detêm o conhecimento da tecnologia adequada para multiplicação dos endósporos da *Pasteuria* spp. *in vitro*, através da obtenção de um fermentado. Foi lançado comercialmente para o ano de 2014 o produto Clariva nos EUA, registrado para

o nematoide do cisto da soja (*Heterodera glycines*), contendo *Pasteuria nishizawae* (<http://www.paginarural.com.br/noticia/202495/syngenta-divulga-resultados-do-primeiro-trimestre-de-2014>).

Em resposta às poucas opções de controle dos nematoides, alternativas ambientais seguras para o controle dos mesmos são de grande interesse. Entre as mais promissoras dessas alternativas estão os agentes de controle biológico que visam especificamente estas pragas (DUAN et. al., 2003).

Foram encontradas estas bactérias parasitando muitos nematoides de importância econômica (SAYRE & STARR, 1988). O gênero *Pasteuria* foi relatado a partir de 323 espécies de nematoides pertencentes a 116 gêneros, incluindo os fitonematoides, entomopatogênicos, predadores e os de vida livre (CHEN & DICKSON, 1998).

Análise de sequências do gene 16S rRNA é uma ferramenta bem estabelecida e sensível para detecção e análise filogenética de bactérias (STAHL, 1997). O uso de sequências do gene 16S rRNA pode identificar as espécies de *Pasteuria* e avaliar a diversidade destas bactérias dentro de uma população de nematoides de amostras sendo de grande benefício para a compreensão da interação nematoide-parasita e ecologia da *Pasteuria* (ANDERSON et al., 1999; ATIBALENTJA et al., 2000; BEKAL et al., 2001; EBERT et al., 1996).

Todas as espécies de *Pasteuria* conhecidas são parasitas obrigatórios. Até recentemente o gênero possuía quatro espécies *Pasteuria nishizawae*, *P. penetrans*, *P. ramosa* e *P. thornei* (CHEN & DICKSON, 1998; OOSTENDORP et al., 1990).

Durante muitos anos, houve tentativas para o cultivo axênico de *Pasteuria* spp. (BISHOP e ELLAR, 1991; WILLIAMS et al., 1989). Porém, um avanço na direção de cultivo *in vitro* de *P. penetrans* foi anunciado recentemente (HEWLETT et al., 2002).

Foi realizado um estudo do ciclo de vida da bactéria que parasita o *Heterodera glycines* através da germinação do endósporo que infecta o J2 para a produção da próxima geração de endósporos em fêmeas adultas e cistos. As descrições foram baseadas em exame microscópico de sucessivas fases juvenis de *H. glycines* excisadas de raízes da soja ao contrário de *P. nishizawae*, que foram baseadas unicamente no exame de cistos doentes (SAYRE et al. 1991a, 1991b).

De acordo com Atibalentja et al. (2004) o desenvolvimento da bactéria, a germinação do endósporo e a penetração do tubo germinativo dentro do nematoide devem começar logo após a penetração do J2 no sistema radicular da soja.

Caso contrário o endósporo não germina, não havendo nenhuma infecção de *Pasteuria*. Por esta razão, as observações baseadas unicamente em cistos doentes proporcionaram uma interpretação incompleta do ciclo de vida da *Pasteuria*, o que pode explicar por que a germinação de *P. nishizawae* não foi observada (SAYRE et al., 1991a, 1991b).

Após a germinação do endósporo microcolônias primárias são formadas a semelhança de uma couve-flor, no estágio J3. Não se observou o desenvolvimento da bactéria em adultos machos somente em fêmeas. Posteriormente, houve a esporulação com a formação de uma estrutura a semelhança de um cacho de uva, sendo também visto em juvenis de quarto estágio de fêmeas imaturas e cistos. Por último foi observado a presença de esporângios maduros e endósporos variando somente o número dependendo do tamanho da fêmea ou cisto, a partir de 30.000 até 820.000 com média e desvio padrão de 314.000 e 234.000 respectivamente (ATIBALETJA et. al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ocorrência natural de *Pasteuria nishizawae* em áreas agrícolas com cultivo de soja

Amostras de solo com presença de cistos provenientes de lavouras de soja estabelecidas em locais diferentes do Brasil (Tabela 1) foram processadas.

Parte restante do solo dessas 10 amostras processadas foi adicionada individualmente em vasos de cerâmica e os mesmos mantidos em casa de vegetação da Estação Experimental da Syngenta em Uberlândia – MG. Realizou-se a semeadura da cultivar de soja suscetível Lee 74E, a fim de proporcionar a multiplicação de *Heterodera glycines*.

Tabela 1 - Local de origem das amostras analisadas no ensaio de ocorrência natural de *Pasteuria nishizawae* em solos brasileiros.

Identificação	Municípios	Estados
H.g 1	Jataí	GO
H.g 2	Sorriso	MT
H.g 3	Campo Alegre	GO
H.g 4	Lucas do Rio Verde	MT
H.g 5	Luís Eduardo Magalhães	BA
H.g 6	Campo Alegre	GO
H.g 7	Nova Mutum	MT
H.g 8	Campo Alegre	GO
H.g 9	Luís Eduardo Magalhães	BA
H.g 10	Londrina	PR

Após 28 dias da semeadura, retirou-se uma alíquota de 150cm³ de solo e então a mesma foi processada pela técnica da flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964).

Da suspensão obtida foi observada uma alíquota de 1mL em câmara de Peters, com o auxílio do microscópio invertido, verificando a presença ou ausência de endósporos da bactéria aderidos na cutícula dos nematoides extraídos. Em seguida, procedeu-se o cálculo da porcentagem de nematoides que apresentaram a bactéria aderida ao seu corpo em relação ao total observado na suspensão.

3.2 Infectividade de *Heterodera glycines* em cultivares de soja resistente e suscetível

Foram instalados dois ensaios em casa de vegetação da Estação Experimental da Syngenta, Uberlândia – MG, seguindo o delineamento inteiramente casualizado (DIC).

3.2.1 1º Ensaio: comparação da infectividade entre cultivar resistente e suscetível

O primeiro ensaio foi montado com a finalidade de confirmar a diferença de infectividade entre as cultivares suscetível (experimental) e resistente (P98Y12). Este foi composto por dois tratamentos e 10 repetições, totalizando 20 parcelas.

Para a montagem do ensaio, foi utilizado solo previamente autoclavado na proporção 2:1 (areia:solo) acondicionado em vasos de plástico com capacidade de 1L. A inoculação de 4.000 ovos e/ou juvenis de *Heterodera glycines*, dessa forma foi realizada 5 dias após a semeadura.

No decorrer do ensaio houve um monitoramento das temperaturas do ar e do solo, já que esta última é de fundamental importância, no ciclo de vida deste patógeno além da umidade do solo. O monitoramento da rega foi realizado por um sistema automatizado por meio de aspersão.

Segundo Campos e colaboradores (2011), para o desenvolvimento de uma fêmea adulta com ovos é necessário que a soma térmica seja de 500 graus-dias (GD). Para que seja realizado, o monitoramento da temperatura considera-se a temperatura ambiente média (°C), além da temperatura base (°C), ou seja, a menor temperatura que o nematoide consegue manter o seu desenvolvimento normal, que seria de 10°C, abaixo disso, as suas atividades são inibidas.

De acordo com Rocha et al. (2005) procedeu-se a avaliação da penetração de juvenis de 2º estágio, 15 dias após a inoculação do nematoide, através da coloração das raízes utilizando suco corante da indústria alimentícia (Su-kinho, sabor uva). O procedimento é simples e de fácil execução, sendo utilizado para substituir a fucsina ácida, que é um solvente cancerígeno e tóxico a saúde humana.

Para tal procedimento, inicialmente, as raízes foram lavadas e transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio a 1,5% e mantidas por 10min. Em seguida, elas foram lavadas em água corrente por 1min., visando eliminar os resíduos da solução (ROCHA et al. 2005).

As raízes foram transferidas para tubos devidamente limpos e identificados, em seguida, adicionou-se uma solução aquosa corante (suco) 1%, até cobri-las. A água foi aquecida em recipiente apropriado para realização de banho-maria. Quando a água atingiu o ponto de ebulição, os tubos de vidro contendo as raízes em solução corante foram imersos durante 2min. Após esse período, os tubos foram retirados do banho-maria e colocados em condições ambientais por, no mínimo, 5h ou overnight para resfriamento (ROCHA et al. 2005).

Após o resfriamento, retiraram-se as raízes, que foram lavadas sobre a peneira de 400 *mesh* para remover o excesso de corante e evitar a perda de raiz. Logo após, as raízes foram transferidas para a solução de glicerina e água destilada (1:1) onde permaneceram por, no mínimo, 5h. Em seguida, foram montadas lâminas de vidro (23x8cm) e realizou-se a contagem dos juvenis penetrados com o auxílio de um microscópio estereoscópio (lupa).

3.2.2 2º Ensaio: efeito do tratamento de sementes sobre a cultivar suscetível

No segundo ensaio utilizou-se a cultivar suscetível, para estudar o efeito do tratamento de sementes contendo produto biológico à base da bactéria *Pasteuria nishizawae* na dose de 300mL. ha⁻¹. Este ensaio foi composto por dois tratamentos e 10 repetições, totalizando 20 parcelas.

A soja suscetível foi semeada e imediatamente procedeu-se a inoculação de 4.000 ovos e/ou juvenis de 2º estágio de *Heterodera glycines*. Após 15 dias, avaliou-se a penetração utilizando-se o método da coloração do nematoide nas raízes, como descrito anteriormente.

Depois de transcorridos 28 dias da inoculação, foi realizada a contagem do número de fêmeas presentes nas raízes. Esta avaliação consistiu na lavagem do sistema radicular, sobre as peneiras de 20 e 100 *mesh*, sendo os resíduos mais grosseiros descartados na primeira peneira e as fêmeas recolhidas na peneira de 100 *mesh*. A contagem das fêmeas foi realizada em placas de Petri com diâmetro de 13,5cm, utilizando-se um microscópio estereoscópio (lupa).

Para a separação dos cistos, utilizou-se uma solução concentrada de sacarose na proporção de 1,0kg de açúcar para 1L de água. Dessa forma, os cistos por serem menos densos que a solução de sacarose, mantiveram em suspensão, onde posteriormente foram lavados para retirada do excesso de sacarose sobre peneira de 500 *mesh*.

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o Programa SISVAR e para comparação das médias foi utilizado o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.3 Eficiência de doses crescentes do produto à base de *Pasteuria nishizawae* no controle de *Heterodera glycines*

Neste ensaio, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e cinco repetições, totalizando 20 parcelas. Foi utilizada a cultivar suscetível, com doses crescentes de *Pasteuria nishizawae*, no tratamento de sementes. As doses utilizadas foram: 0, 150, 300 e 600mL do produto formulado. ha⁻¹.

Para a montagem do ensaio, foi utilizado solo autoclavado na proporção 2:1 (areia:solo) colocado em vasos com capacidade de 1 L. Após o tratamento de sementes, a inoculação dos nematoides foi realizada no momento da semeadura com 4.000 ovos e/ou juvenis por vaso.

Procedeu-se a primeira avaliação aos 15 dias após a inoculação com a coloração de nematoides em raízes e a segunda avaliação foi realizada aos 28 dias após a inoculação com a contagem do número de cistos.

O programa estatístico SPSS foi usado para os testes de homogeneidade das variâncias e de normalidade dos resíduos. Enquanto o Programa estatístico SISVAR foi utilizado para o Teste de Regressão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ocorrência natural de *Pasteuria nishizawae* em áreas agrícolas com cultivo de soja

Em todas as 10 amostras analisadas oriundas de várias localidades do Brasil, a frequência de ocorrência da bactéria *Pasteuria nishizawae* foi de 100%, ou seja, foram encontrados endósporos da bactéria aderidos à cutícula de todos os nematoides *Heterodera glycines* extraídos do solo após 28 dias da semeadura da soja (Tabela 2).

Tabela 2 - Ocorrência natural e frequência de *Pasteuria nishizawae* em amostras oriundas de diferentes localidades do Brasil.

Identificação	Total de juvenis 2º estágio na amostra	Frequência de endósporos de <i>P. nishizawae</i> aderidos (%)
H.g 1	720	100
H.g 2	294	100
H.g 3	294	100
H.g 4	396	100
H.g 5	156	100
H.g 6	76	100
H.g 7	442	100
H.g 8	105	100
H.g 9	90	100
H.g 10	116	100

No Brasil, os estudos sobre *Pasteuria* spp. são ainda muito incipientes, principalmente com relação a sua utilização no controle de espécies de *Pratylenchus* e *Heterodera*. A grande maioria das pesquisas sobre o tema já é realizada no país com enfoque ao nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.).

Lordello (1966) relatou pela primeira vez, no Brasil, a ocorrência de *Pasteuria* spp. em fêmeas de *Meloidogyne javanica*, infectando plantas de tomateiro procedentes de Varginha em Minas Gerais.

Santos (1981) observou essa bactéria em juvenis de segundo estágio de *M. javanica* extraídos de solo coletado na rizosfera de feijoeiro altamente infectado pelo nematoide, em Petrolina (PE). Posteriormente, vários trabalhos foram realizados sobre o parasitismo de *Pasteuria* spp. em nematoides, sendo que na grande maioria deles foi

verificada a ação da bactéria sobre espécies de *Meloidogyne* (PIMENTA; CARNEIRO, 2005).

De acordo com o trabalho realizado por Souza, Souza e Campos (1996), *Pasteuria* spp. foram observadas em 29,69% das amostras coletadas em 128 locais e 28 espécies vegetais de Minas Gerais, como constatado em outros países como África do Sul (SPAULL, 1984), Austrália (STIRLING; WHITE, 1982; BIRD; BRISBANE, 1988), EUA (WALTER; KAPLAN, 1990; HEWLETT et al., 1994) e Espanha (VERDEJO- LUCAS, 1992).

Essa bactéria estava infectando 14,61%, 8,66%, 7,30% e 4,21%, respectivamente, da população de *Helicotylenchus dihystera* (Cobb) Sher, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus brachyurus* e *Tylenchus* sp. Bastian extraídas do solo (SOUZA, SOUZA; CAMPOS, 1996).

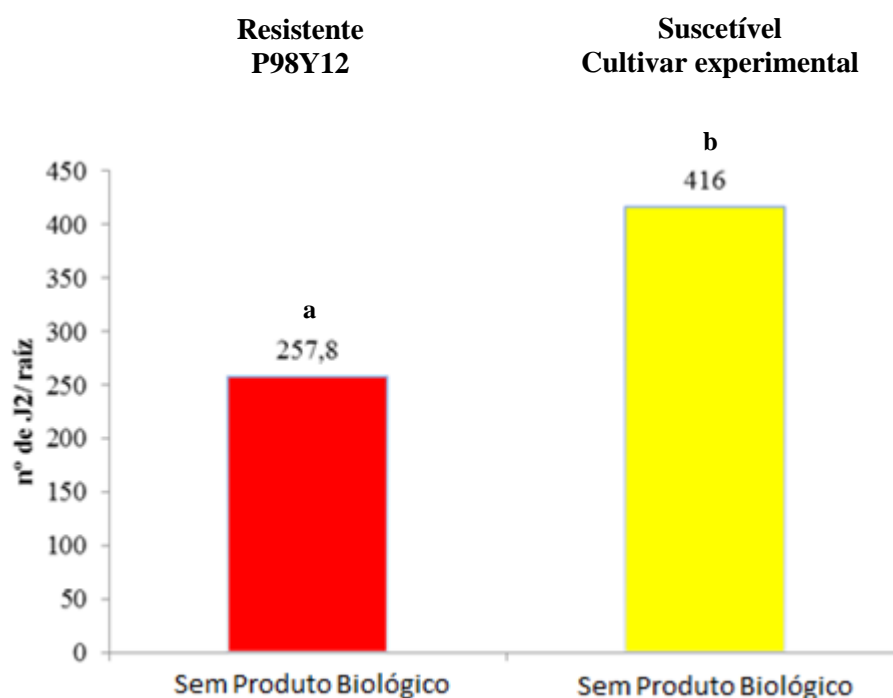
Não há registro da ocorrência de *Pasteuria* spp. em regiões com temperatura média anual abaixo de 10°C, e a maior ocorrência se dá em temperaturas médias anuais acima de 21°C (CHEN; DICKSON, 1998).

4.2 Infectividade de *Heterodera glycines* em cultivares de soja resistente e suscetível

4.2.1 1º Ensaio: comparação da infectividade entre cultivar resistente e suscetível

O número de juvenis penetrados por raiz foi maior na cultivar suscetível diferindo estatisticamente da cultivar resistente (Figura 1).

Figura 1 - Número de juvenis de *Heterodera glycines* penetrados por sistema radicular nas cultivares resistente e suscetível.



CV = 5,63%, Teste T 5%

Em patossistemas onde existe uma relação mais especializada entre o hospedeiro e o parasita, como é o caso daqueles envolvendo os gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera* Skarbilorrich, o desenvolvimento de cultivares resistentes encontra-se mais adiantado, devido ao mecanismo mais específico do nematoide que é a formação das células especiais de alimentação.

As plantas desenvolvem uma grande variedade de mecanismos de resistência às doenças, que incluem síntese de fitoalexinas, antibióticos, inibidores de protease; deposição de material de parede celular e acumulação de enzimas hidrolíticas como as quitinases. Aparentemente, a resistência da planta depende da habilidade do hospedeiro em reconhecer o patógeno e, rapidamente, induzir os mecanismos de defesa a tempo de limitar a ação do patógeno. A aplicação de tecnologias moleculares tem gerado informações significativas sobre os mecanismos de reconhecimento de patógenos, tradução de sinais e ativação de genes de defesa (CRAMER, et al., 1993).

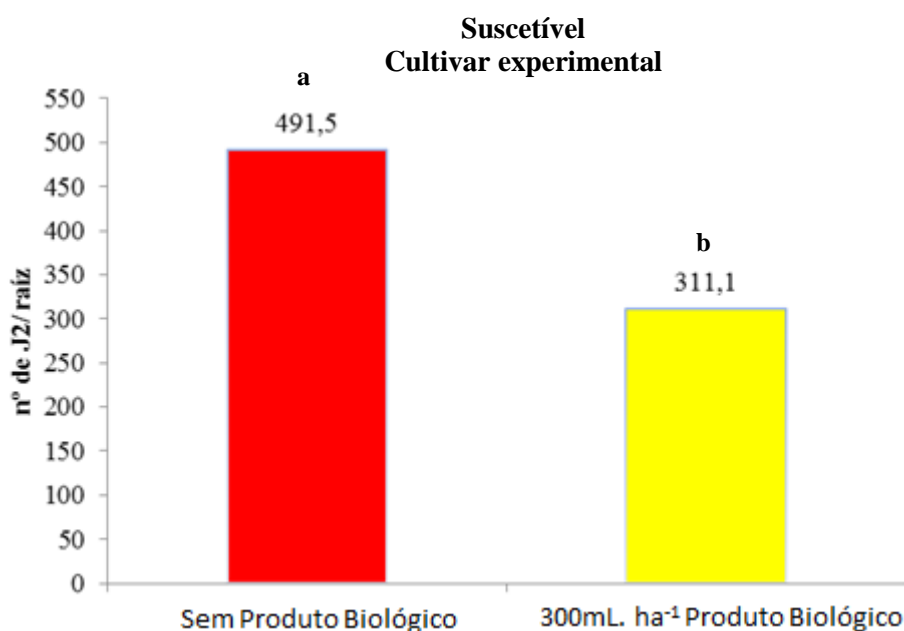
A resistência diz respeito a efeitos de genes de uma planta capazes de restringir a multiplicação de um determinado nematoide em seus tecidos. Enquanto a tolerância ao dano é independente da resistência e diz respeito à habilidade de uma dada planta hospedeira em compensar ou recuperar-se dos efeitos adversos de ataque por

determinado nematoide e produzir bem. Vale ressaltar que a resistência não protege a planta da invasão do nematoide.

4.2.2 2º Ensaio: efeito do tratamento de sementes sobre a cultivar suscetível

A Figura 2 mostra que na cultivar que recebeu o tratamento com o produto biológico a base de *Pasteuria nishizawae* na dose 300mL. ha⁻¹, houve menor penetração de juvenis no sistema radicular.

Figura 2 - Número de juvenis de *Heterodera glycines* penetrados por raiz na cultivar suscetível, com ou sem a aplicação do produto biológico a base de *Pasteuria nishizawae*.



CV = 5,43%, Teste T 5%

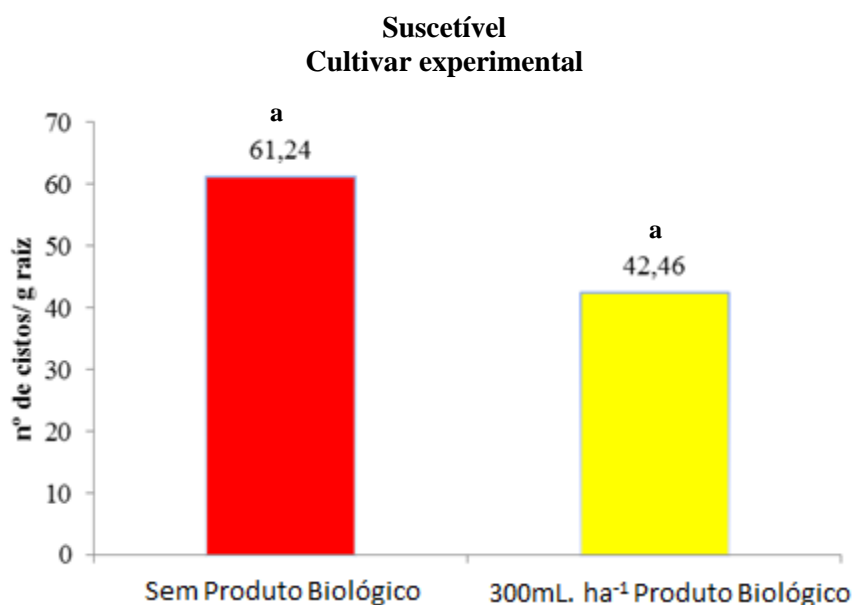
Até algum tempo atrás, todos os trabalhos realizados para determinação da diferença de concentração dos endósporos de *Pasteuria* spp. aderidos à cutícula dos juvenis recorriam à hipótese de obtenção *in vivo* dos mesmos. visto que, por ser um parasita obrigatório, não seria possível a multiplicação da bactéria na ausência do organismo hospedeiro.

Sendo assim, sem a possibilidade de sua produção em meio de cultura o uso como nematicida biológico era limitante, mas a associação deste organismo, em manejo integrado de nematoides, faz com que sua ação se potencialize com o tempo, até que o solo se torne supressivo.

A Empresa norte-americana *Pasteuria Bioscience*, recentemente adquirida pela Syngenta, detém o conhecimento da tecnologia adequada para multiplicação dos endósporos da *Pasteuria* spp. *in vitro*, através da obtenção de um fermentado. Foi lançado comercialmente para o ano de 2014, o produto Clariva nos EUA, registrado para o nematoide do cisto da soja (*Heterodera glycines*).

Enquanto na Figura 3 observa-se que o número de cistos não diferiu entre o tratamento ou não das sementes com a bactéria. Isso pode ter ocorrido pelo fato do cisto ser formado independente se a fêmea vai formar ovos ou não. O cisto parte do princípio que ocorre endurecimento e escurecimento da parede do corpo e a morte da fêmea.

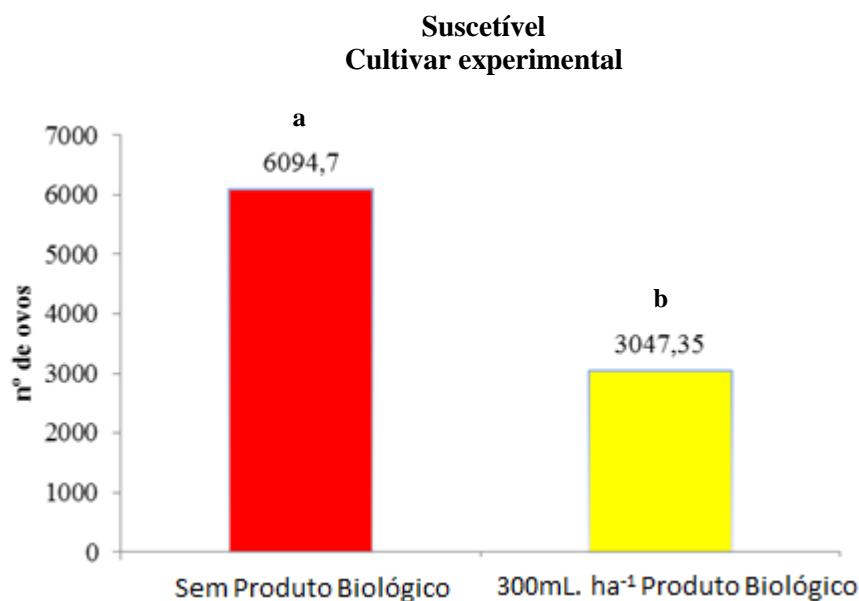
Figura 3 - Número de cistos de *Heterodera glycines* por grama de raiz na cultivar suscetível, com ou sem a aplicação do produto biológico a base de *Pasteuria nishizawae*.



CV = 12,83%, Teste T 5%

Para a Figura 4 observa-se redução significativa do número de ovos no tratamento de sementes com o produto biológico. As fêmeas são utilizadas para multiplicar os endósporos, não havendo a produção de ovos.

Figura 4 - Número total de ovos de *Heterodera glycines* por sistema radicular na cultivar suscetível, com ou sem a aplicação do produto biológico a base de *Pasteuria nishizawae*.



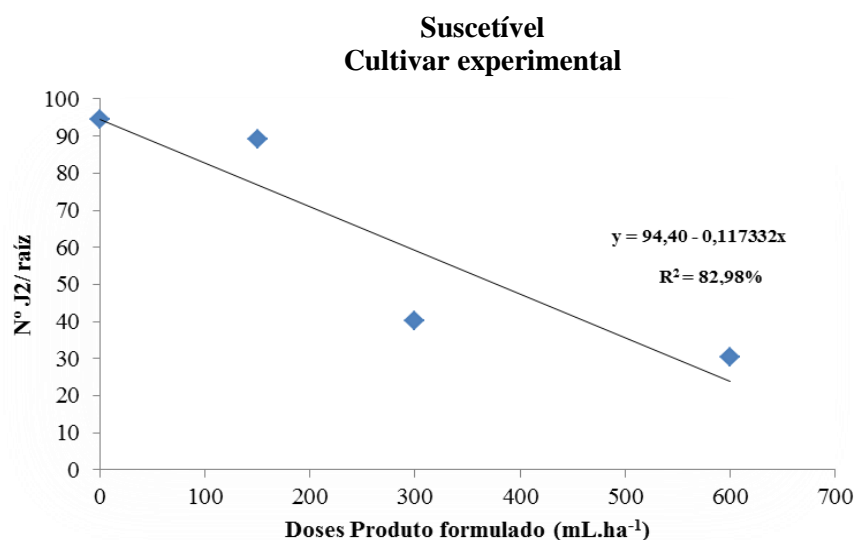
CV = 7,88%, Teste T 5%

4.3 - Eficiência de doses crescentes do produto a base de *Pasteuria nishizawae* no controle de *Heterodera glycines*

O Gráfico 1 mostra a linearidade decrescente, ou seja, quanto maior a dose de *Pasteuria nishizawae*, menor o número de juvenis penetrados no sistema radicular até a dose de 600mL. ha⁻¹.

Para a normalidade das variâncias foi utilizado o Teste de Levene ($F = 3,893$) a significância de 0,01. Enquanto que para a normalidade dos resíduos foi utilizado o Teste de Shapiro-Wilk ($W = 0,972$) a significância de 0,05.

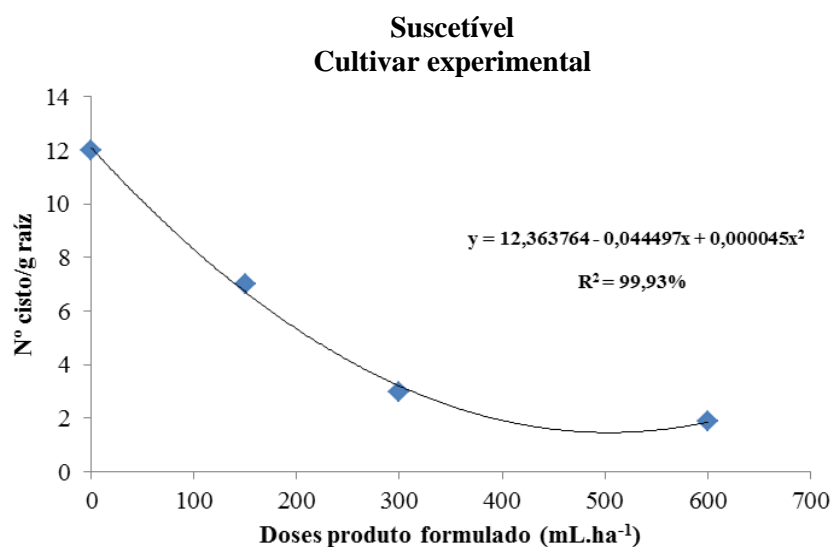
Gráfico 1 - Número de juvenis penetrados de *Heterodera glycines* por sistema radicular na cultivar suscetível, em função das diferentes doses de *Pasteuria nishizawae*.



CV = 46,92%, Teste de Regressão

No Gráfico 2, a curva de segundo grau revela pelo seu ponto mínimo ($x = 494,41$) a dose de 494,41mL para se alcançar o menor número de cistos/ grama de raiz.

Gráfico 2 - Número de cistos de *Heterodera glycines*/ g de raiz na cultivar suscetível, em função das diferentes doses de *Pasteuria nishizawae*.



CV = 43,38%, Teste de Regressão

Para a normalidade das variâncias foi utilizado o Teste de Levene ($F = 2,204$) a significância de 0,01. Enquanto que para a normalidade dos resíduos foi utilizado o Teste de Shapiro-Wilk ($W = 0,966$) a significância de 0,05.

Estudos mostram que dependendo da quantidade de endósporos aderidos à cutícula do nematoide o mesmo pode penetrar na raiz não havendo a reprodução, caso a quantidade seja reduzida, ou, em maiores quantidades, acontecerá a penetração.

De acordo com o trabalho realizado por Gomes et al. (2002), a quantidade de juvenis penetrados nas raízes do tomateiro foi inversamente proporcional ao número médio de endósporos que os J2 de *M. javanica* apresentaram em sua cutícula ao serem inoculados na planta. Observaram que a média de 10 endósporos/ J2 reduziu 50% do número de J2 penetrados em comparação com a testemunha.

Plantas de tomateiro inoculadas com J2 apresentando média de 60 a 90 endósporos aderidos à cutícula foram penetradas, 5,90 a 10,94% do que penetrariam se não estivessem com os endósporos aderidos. Stirling (1984) e Sekhar e Gill (1990), observaram a penetração do nematoide nas raízes de plantas mesmo com juvenis apresentando mais de 40 endósporos de *Pasteuria penetrans*. Portanto, mesmo na presença de elevado número de endósporos na cutícula do nematoide é possível ocorrer a penetração nas raízes.

Davies et al. (1988) ao inocularem J2 de *M. incognita* infestados com 15 e 25 endósporos/ J2, em tomateiro, observaram reduções de 72 e 80% na penetração de raízes. Sekhar e Gill (1990) acreditam que a redução na penetração do nematoide pode ser devido a dificuldade de mobilidade que o J2 apresenta ou devido à interferência no reconhecimento das biomoléculas liberadas pelas raízes e àquelas que se encontram presentes nos sítios receptores da cutícula do nematoide.

De acordo com os autores Mankau e Prasad (1977), juvenis de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* tiveram seu movimento comprometido quando mais de três esporos encontraram-se aderidos à cutícula. Outro trabalho realizado por Rao et al. (1997) mostra que 64% das fêmeas apresentavam-se infectadas quando oito a doze esporos estavam aderidos à cutícula do juvenil.

5 CONCLUSÕES

- *Pasteuria nishizawae* apresenta ocorrência natural nos solos brasileiros com cultivo de soja;
- O tratamento de sementes de soja com o produto biológico a base de *Pasteuria nishizawae* proporcionou menor número de juvenis penetrados;
- O menor número de cistos ocorreu na dose de 494,41mL do produto biológico em cultivar suscetível.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. New York: Academic Press, 1988. 803 p.
- ANDERSON, J. M.; PRESTON, J. F.; DICKSON, D. W.; HEWLETT, T. E.; WILLIAMS, N. H.; MARUNIAK, J. E. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Nematology**, College Park, v.31, p. 319–325, 1999.
- ATIBALENTJA, N. G.; NOEL, G. R.; DOMIER, L. L. Phylogenetic position of the North American isolate of *Pasteuria* that parasitizes the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, as inferred from the 16S rDNA sequence analysis. **Int J Syst Evol Microbiol**, Reading, v.50, p.605–613, 2000.
- ATIBALENTJA, N.; JAKSTYS, B.P.; NOEL, G. R. Life Cycle, Ultrastructure, and Host Specificity of the North American Isolate of *Pasteuria* that Parasitizes the Soybean Cyst Nematode, *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 36, n.2, p.171–180. 2004.
- ATIBALENTJA, N.; NOEL, G. R.; CIANCIO, A. A simple method for PCR amplification, cloning, and sequencing of *Pasteuria* 16S rDNA from small numbers of endospores. **Journal of Nematology**, College Park, v.36, p.100–105, 2004.
- ATKINS, S.D.; HIDALGO, L.; KALISZ, H.; MAUCHLINE, T.H.; HIRSCH, P.R.; KERRY, B.R. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**, West Sussex, v.59, p.183–189, 2003.
- BEKAL, S.; BOMEMAN, J.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; BECKER, J. O. Phenotypic and molecular analysis of a *Pasteuria* strain parasitic to the sting nematode. **Journal of Nematology**, College Park, v.33, p.110–115, 2001.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal de bruzone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25, p.1165–1174, 1990.
- BIRD, A. F.; BRISNANE, P.G. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. **Rev. Nematol**, [S.l.], v.11, n.1, p.75–81, 1988.
- BISHOP, A. H.; ELLAR, D. J. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* in vitro. **Biocontrol Science and Technology**, Hauppauge, v. 1, p.101–114, 1991.
- BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba: ESALQ, 2000. p.1- 18.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo : origem, história e distribuição. In : MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas : ITAL, 1981. p.1-6.

CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C.; CAMPOS, V.P.; SILVA, L.H.C.P. da; COSTA, L.S.A.S.; SILVA, W.J.R. da. Efeito da temperatura do solo na infectividade e reprodução de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em cultivares de soja. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.35, n.5, p.900-907, set/out, 2011.

CHARLES, L.; CARBONE, I.; DAVIES, K.G.; BIRD, D.; BURKE, M.; KERRY, B.R. et al. Phylogenetic Analysis of *Pasteuria penetrans* by Use of Multiple Genetic Loci. **J Bacteriol**, Washington, v. 187, n.16, p. 5700-5708, 2005.

CHEN, Z. X., DICKSON, D. W. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, ecology, and biological control potential. **Journal of Nematology**, College Park, v. 30, p. 313-340, 1998.

CHUNG, G.; SINGH, R.J. Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 27, n.5, p. 295-341, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **CONAB**. Acompanhamento da Safra Brasileira. Disponível em:
<<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2013/02/conab>> Acesso em: 23 nov. 2013.

COSTA, D. C.; FERRAZ, S. Avaliação do efeito antagônico de algumas espécies de plantas, principalmente de inverno, a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.14, n.1, p.61-70, 1990.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, São Paulo, v.23, p. 4, 2000.

CRAMER, C.L.; WEISSENBERN, D.; COTTINGHAM, C. K.; DENBOW, C. L.; EISENBACK, J. D.; RADIN, D. N.; YU, X. Regulation of defense – related gene expression during plant pathogen interactions. **Journal of Nematology**, College Park, v.25, n. 4, p. 507-518, 1993.

DALLA PRIA, M. **Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados**. f. 1992. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de . Universidade Federal de Viçosa, 101 p.

DAVIES, K.G. Interactions between nematodes and microorganisms: bridging ecological and molecular approaches. **Adv Appl Microbiol**, New York, v. 57, p. 53-78, 2005.

DAVIES, K.G.; KERRY, B.R.; FLYNN, C.A. Observation on the patogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, London, v.112, p. 491-501, 1988.

DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R.; DENNEHY, J.A. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. **Nematologica**, Leiden, v. 39, p. 115-126, 1993.

DIAS, W.P.; FERRAZ, S. Avaliação de espécies de *Arthrobotrys* para o controle de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 189-192, 1994.

DIAS, W.P.; GARCIA, A.; SILVA, J.F.V.; CARNEIRO, G.E.S. **Nematoides em soja: Identificação e Controle**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 8p. (Circular Técnica 76).

DRINGRA, O.D.; MENDONÇA, H.L.; MACEDO, D.M. Doenças e seu controle. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecnas, p. 133-155, 2009.

DUAN, Y.P.; CASTRO, H.F.; HEWLETT, T.E.; WHITE, J.H.; OGRAM, A.V. Detection and characterization of *Pasteuria* 16S rRNA gene sequences from nematodes and soils. **Int J Syst Evol Microbiol**, Reading, v.53, p: 105–112, 2003.

EBERT, D.; RAINEY, P.; EMBLEY, T. M.; SCHOLZ, D. Development, life cycle, ultrastructure and phylogenetic position of *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888: rediscovery of an obligate endoparasite of *Daphnia magna* Straus. **Philos Trans R Soc Lond B**, London, v.351, p:1689–1701, 1996.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil – 2004**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. >Acesso: 10 dez. 2013.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil – 2009 e 2010**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 262p. 2008.

ENDO, B.Y. Cellular response to infection. In: RIGGS, R.D.; WHATHER, J.A. (Eds.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St. Paul: APS Press, p.37-49, 1992.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Disponível em: http://www.usfumigation.org/Chemical_Herbicides/Glyphosate/glyphosate.htm. Acesso em: 10 dec. 2013.

FERRAZ, S.; SANTOS, M.A. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Proteção de Plantas**, [S.l.]v.3, p. 283-314, 1995.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 84p. (Caderno didático, 58).

GARCIA, A.; SILVA, J.F.V.; PEREIRA, J.E.; DIAS, W.P. Rotação de culturas e manejo do solo para controle do nematoide de cisto da soja. In: **Sociedade Brasileira de Nematologia** (Ed.) O Nematoide de cisto da soja: a experiência brasileira. Jaboticabal: Artsigner Editores. p-55-70, 1999.

GIBLIN-DAVIS, R.M.; WILLIAMS, D. S.; BEKAL, S.; DICKSON, D.W.; BRITO, J. A.; BECKER, J. O.; PRESTON, J. F. 'Candidatus *Pasteuria usgae*' sp. nov., an obligate endoparasite of the phytoparasitic nematode *Belonolaimus longicaudatus*. **Int J Syst Evol Microbiol**, Reading, v.53, p. 197–200, 2003.

GOLDEN, A.M.; MEDINA, M.R.A. *Heterodera glycines* en soya y frijol en el Valle del Cauca, Colômbia, **Nematrópica**, [S.l], v.13, p. 229-237, 1983.

GOMES, C.B.; FREITAS, L.G. de.; FERRAZ, S.; OLIVEIRA, R.D.de L.; OSÓRIO, V.A. Efeito do número de endósporos de *Pasteuria penetrans* e do método de promoção da adesão sobre a penetração de *Meloidogyne javanica* e produção da bactéria em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2002.

HEWLETT, T.E.; COX, R.; DICKSON, D.W. & DUNN, R.A. Occurrence of *Pasteuria* sp. In Florida. **Journal of Nematology**, College Park, v.26, n.4, p. 616-619, 1994.

HEWLETT, T. E.; GERBER, J. F.; SMITH, K. S.; WHITE, J. H. In vitro culture of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, College Park, v.4, p:152–153 (Abstr.), 2002.

HIDALGO, L.; PUERTAS, A.; PETEIRA, B.; MONTES DE OCA, N.; ARÉVALO, J.; HERNANDÉZ, M.A.; KERRY, B. Effect of Klamic on the reduction of *Meloidogyne incognita* populations in vegetable crops. **Nematrópica**, [S.l], p. 35: 77, 2005.

INOMOTO, M. M. **Principais nematoides na cultura da soja e seu manejo**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006.

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

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, [S.l], v. 48, p. 692, 1964.

KERRY, B.R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant – parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 423-441, 2000.

KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., McINROY, J.A. & YOUNG R.W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, The Hague, v.139, p.74-84, 1992.

KREBS, B.; JUNGE, H.; OCKHARDT, A. *Bacillus subtilis*: an effective biocontrol agent. **Pesticides Sciences**, [S.l], v.37, p.427-429, 1993.

LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja**, Londrina, p. 46, 2010. (Embrapa Soja. Documentos, 319).

- LINFORD, M.B.; YAP, F. Root-knot nematode injury restricted by a fungus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 29, p. 596- 608, 1939.
- LORDELLO, L.G.E. Nota sobre um parasito de nematoide. **Revista de Agricultura**, [S.l.], v. 41, n. 2, p. 67-69, 1966.
- MANKAU, R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. **J Invertebr Pathol**. New York, v. 26, p. 333-339, 1975.
- MANKAU, R. Biocontrol: fungi as nematode control agents. **Journal of Nematology**, College Park, v. 12, p. 244-252, 1980.
- MANKAU, R.; PRASAD, D.N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, v. 9, p.40-45, 1977.
- MICOLETZKY, H. Die freilebenden Susswasser und Moornematoden Danemarks. **Copenhagen: Host and Son**. København, 1925.
- NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P. Época de aplicação e testes de isolados de fungos predadores no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.17, p. 182-192, 1993.
- NEIPP, P.W.; BECKER, J.O. Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta vulgaris* against *Heterodera schachtii*. **Journal of Nematology**, College Park, v.31, n.1, p.54-61, 1999.
- NOEL, G. R. History, distribution and economics. In: RIGGS, R. D.; WRATHER, J. A., eds. Biology and management of the soybean cyst nematode. **St. Paul: The American Phytopathological Society**. St. Paul, p.1-3, 1992.
- NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.B.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. In: **Encyclopedia of Life Sciences**, Chichester, Macmillan Publishers, Basingstoke, 10 p, 2002.
- NORONHA, M.A., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.20, n.2, p.174-178, 1995.
- OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S.; DIAS-ARIEIRA, C.R. Eficácia de isolados de *Arthrobotrys* spp. no controle de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, p. 49-57, 2002.
- OOSTENDORP, M.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southern United States. **Journal of Nematology**, College Park, v. 23, p: 525–531, 1990.
- OOSTENDORP, M. & SIKORA, R.A. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Review Nematology**, [S.l.], v.14, p. 269-274, 1990.

PIMENTA, C.A.M.; CARNEIRO, R.M.D.G. Utilização *Pasteuria penetrans* em controle biológico de *Meloidogyne javanica* em duas culturas sucessivas de alface e tomate. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia** Brasília, 2005. 36 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 116).

RAO, M. S.; GOWEN. S.R.; PEMBROKE, B.; REDDY, P. Relationship of *Pasteuria penetrans* spores encumbrance on juveniles of *Meloidogyne incognita* and their infection in adults. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, p.129-131, 1997.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SEMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants pests and diseases. **Crop Protection**, Tehran, v.20, p. 1-11, 2001.

RIGGS, R.D., D.P. SCHMITT. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 20, p.392-395, 1988.

ROBINSON, A.F.; JAFFEE, B.A. Repulsion of *Meloidogyne incognita* by alginate pellets containing hyphae of *Monacrosporium cionopagum*, *M. ellipsosporum* or *Hirsutella rhossiliensis*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 28, p. 133- 147, 1996.

ROCHA, F.S.; MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V. P. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.29, n.2, p.293-297, 2005.

SANTOS, J.M. Ocorrência de *Bacillus penetrans* parasitando *Meloidogyne javanica* (Nematoda: Meloidogynidae) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 4, p. 519-522, 1981.

SANTOS, M. A.; RUANO, O. Reação de plantas usadas como adubos verdes a *Meloidogyne incognita* raça 3 e *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.11, p.184- 197, 1987.

SAYRE, R. M.; WERGIN, W.P.; NISHIZAWA, T.; STARR, M. P. Light and electron microscopical study of a bacterial parasite from the cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, Lawrence, v. 58, p:69–81, 1991a.

SAYRE, R. M.; WERGIN, W.P.; NISHIZAWA, T.; 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**, [S.l], v. 142, p:551–564, 1991b.

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

- SAYRE, R. M.; STARR, M. P. Bacterial diseases and antagonisms of nematodes. In Diseases of Nematodes. Edited by G. O. Poinar, Jr & H.-B. Jonson. **Boca Raton, FL:** CRC Press, p. 59 – 101, 1988.
- 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., W. P. WERGIN, T. NISHIZAWA, AND M. P. STARR. Light and electron microscopical study of a bacterial parasite from the cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, Lawrence, v. 58, p. 69–81, 1991.
- SEKHAR, N.S.; GILL, J.S. Penetration and multiplication of *Meloidogyne incognita* as influenced by *Pasteuria penetrans*. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 20, n. 2, p. 213-218, 1990.
- SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Controle biológico de *Meloidogyne arenaria* com *Pausteria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.23, n.1, p.47-52, 1999.
- SHARMA, R.D.; VIVALDI, L.J. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pasteuria penetrans*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio De Janeiro, v.34, n.11, p.2065-2069, 1999.
- SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of *Heterodera cajani* and *Fusarium udum* by *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Glomus fasciculatum* on “pigeonpea”. **Fundam. Appl. Nematol**, Montrouge Cedex, v.18, p.559-566, 1995.
- SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: **A review. Bioresource Technology**, Barking, v. 58, p. 229-239, 1996.
- SILVA, J.A.L. **Identificação de raças fisiológicas de *Heterodera glycines* Ichinohe e a avaliação da resistência de genótipos de soja [*Glycines max* (L.) Merrill].** 1998. 58f. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.
- SOARES, P.L.M.; FERRAZ, M.P.S.; BARBOSA, B.F.F.; NOZAKI, M.H.; BRAZ, L.T.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, J.C.; MÚSCARI, A.M. Controle biológico de *Meloidogyne incognita* na produção comercial de pimentão em ambiente protegido. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, p. 112-113, 2005.
- SOUZA, J.T. de; SOUZA, R.M. de; CAMPOS, V. P. Ocorrência e flutuação populacional de *Pasteuria* spp. em Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 20, n. 2, p. 41-51, 1996.
- SPAULL, V.W. Observation on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. **Revue Nématol.**, Montrouge Cedex, v.7, n.3, p. 277-282, 1984.

STAHL, D. A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny. In: **Manual of Environmental Microbiology**, pp. 102–114. Edited by C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach & M. V. Walter. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1997.

STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 1, p. 55-69, 1984.

STIRLING, G.R. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects. **CAB International**, Wallingford, 282 p, 1991.

STIRLING, G.R.; SMITH, L.J. Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root-knot nematodes. **Biological Control**, [S.l.], v. 11, p. 231-239, 1998.

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

STIRLING, G.R.; 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, 1982.

TIAN, H.L.; RIGGS, R.D.; CRIPPEN, D.L. Control of soybean cyst nematode by chitinolytic bacteria with chitin substrate. **Journal of Nematology**, College Park, v.32, n.4, p.370-376, 2000.

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

TORRES, R. G.; RIBEIRO, N. R.; BOER, C. A.; Manejo de nematoides no SPD cerrados -2008. (Circular Técnica). Disponível em www.monsoy.com.br. Acesso em: 12 de nov. 2014.

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**, Guildford, GB, v. 13, p. 455-462, 1994.

VENCATO, A. Z. **Anuário Brasileiro da Soja 2010**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, p. 144, 2010.

VERDEJO-LUCAS, S. Seasonal population fluctuations of *Meloidogyne* spp. and the *Pasteuria penetrans* group in kiwi orchards. **Plant Disease**, St. Paul, v.26, n.12, p.1275-1279, 1992.

VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F.S.; ORNAT, C.; GALEANO, M. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. **Plant Pathology**, New York, v. 52, p.521-528, 2003.

WALTER, D.E.; KAPLAN, D.T. Antagonists of plant-parasitic nematodes in Florida citrus. **Journal of Nematology**, College Park, v.22, n.4, p. 567-573, 1990.

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, p. 145-156. 1989.

WRATHER, J.A.; ANAND, S.C.; DROPKIN, V.H. Soybean cyst nematode control. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n.9, p. 829-833, 1984.

YOUNG, L.D. Epiphytology and life cycle. In: RIGGS, R.D.; WHATHER, J.A. (Eds.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St. Paul: APS Press, p.27-36, 1992.

APÊNDICE

FOTO 1. Manutenção das populações de *Heterodera glycines* provenientes das amostras de solo do campo, sob condições de casa de vegetação.



FOTO 2. A – Contagem de nematoides em suspensão pelo uso da Câmara de Peters e o uso do microscópio invertido para observação dos endósporos da bactéria. B – Suspensões resultantes do processamento das amostras de solo.



FOTO 3. Etapas do procedimento de coloração dos nematoides em raízes utilizando suco artificial.

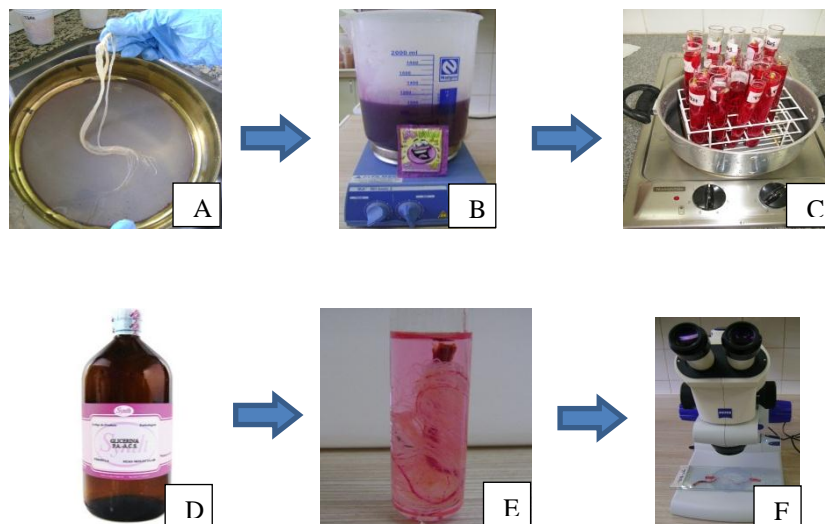


FOTO 4. Etapas da extração dos cistos e sua posterior contagem.

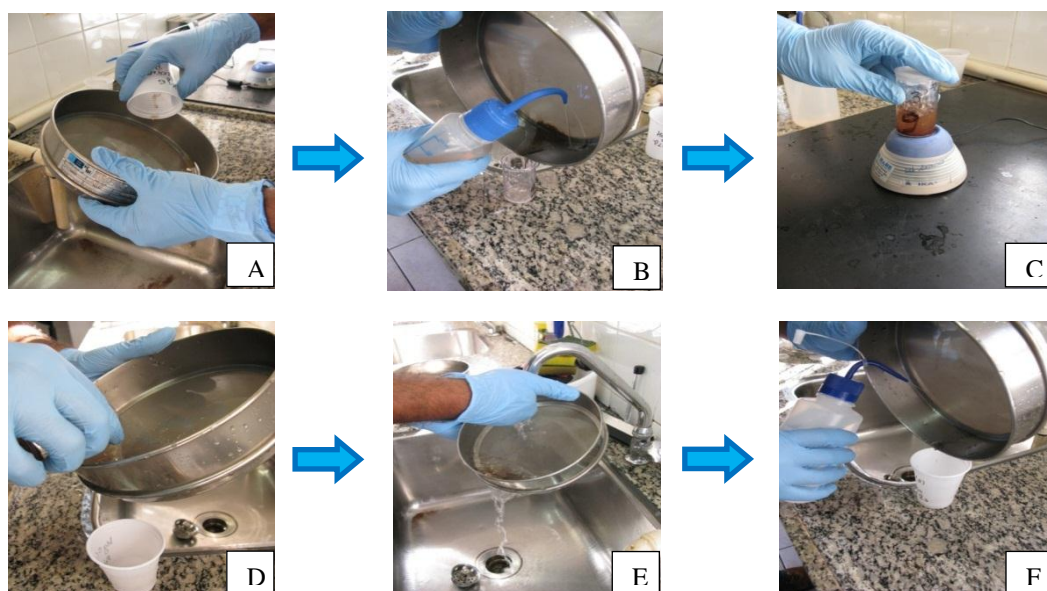


FOTO 5. Observação de juvenis apresentando endósporo de *Pasteuria nishizawae* aderidos à cutícula.

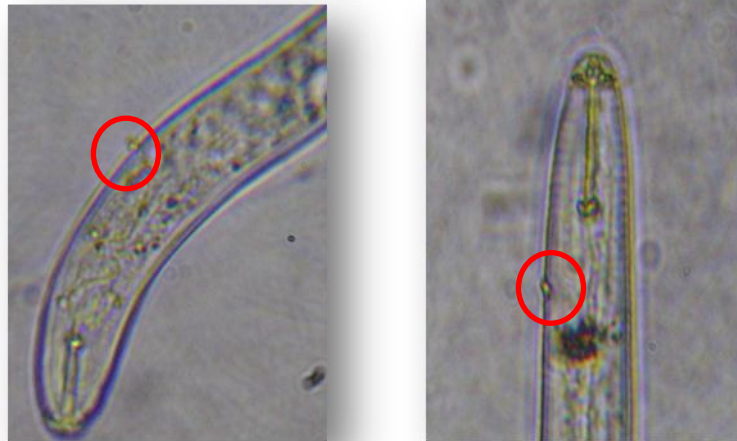


FOTO 6. Observação de juvenis penetrados nas raízes aos 15 dias após a inoculação, coloridos através da solução artificial de suco (Su-kinho, sabor uva).

