

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

MARIELE NAVES RODRIGUES

**DIFERENTES DOSES DE *Bacillus* sp. NA TAXA DE PENETRAÇÃO DE
Meloidogyne incognita E NO CRESCIMENTO VEGETAL DE ALFACE**

**Uberlândia - MG
Novembro – 2009**

MARIELE NAVES RODRIGUES

**DIFERENTES DOSES DE *Bacillus* sp. NA TAXA DE PENETRAÇÃO DE
Meloidogyne incognita E NO CRESCIMENTO VEGETAL DE ALFACE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo.

Orientadora: Maria Amelia dos Santos

**Uberlândia – MG
Novembro – 2009**

MARIELE NAVES RODRIGUES

**DIFERENTES DOSES DE *Bacillus* sp. NA TAXA DE PENETRAÇÃO DE
Meloidogyne incognita E NO CRESCIMENTO VEGETAL DE ALFACE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 10 de novembro de 2009.

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
Membro da Banca

Prof. Dr. Marcus Vinicius Sampaio
Membro da Banca

Prof^a. Dr^a. Maria Amelia dos Santos
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me concedeu a vida e me deu forças para vencer cada obstáculo e conquistar cada objetivo.

Aos meus pais, irmãs, avós e a toda minha família que, com muito carinho, compreensão e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu namorado, Felipe, por me incentivar e estar ao meu lado sempre, me ajudando a superar todas as dificuldades.

Aos meus amigos que de inúmeras maneiras estiveram presentes, em especial minha amiga de infância Maristela.

À minha turma, 38^a, pela amizade e apoio.

À Juliana Piassa pela imensa colaboração, a qual teve fundamental importância para a realização deste trabalho.

À professora e orientadora Maria Amelia dos Santos pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Ao Aires Ney Gonçalves de Souza pela amizade e por toda a colaboração.

Ao Laboratório de Nematologia Agrícola do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram com este trabalho.

RESUMO

A alface é a hortaliça folhosa de maior importância econômica para o Brasil, sendo consumida in natura na forma de salada. Apresenta alta suscetibilidade à infecção por espécies de nematóides de galhas e nos últimos anos, a preocupação em substituir os nematicidas por agentes de controle biológico, tem sido um dos objetivos das pesquisas em Nematologia. Microrganismos rizosféricos, principalmente do gênero *Bacillus*, possuem um grande potencial de controle biológico de nematóides fitopatogênicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de penetração do nematóide *Meloidogyne incognita* em raízes de alface e o crescimento vegetal sob diferentes doses do produto biológico à base de *Bacillus* (Nemix[®]). O experimento foi conduzido na casa de vegetação e no Laboratório de Nematologia Agrícola da UFU, no período de janeiro a maio de 2009, sendo constituído de 5 tratamentos e 10 repetições. Os tratamentos foram as diferentes doses do produto a base de *Bacillus*: 0 kg.ha⁻¹ (testemunha); 5 kg.ha⁻¹; 8 kg.ha⁻¹; 10 kg.ha⁻¹ e 15 kg.ha⁻¹. A parte aérea foi pesada para obtenção da matéria fresca e em seguida colocada na estufa para secagem e determinação do peso. Não houve diferença significativa entre as doses de Nemix[®] quanto ao número de juvenis penetrados e nem para parte aérea seca. Já entre as doses de Nemix[®] para parte aérea fresca houve diferença significativa. Os pesos da parte aérea fresca foram maiores nas doses onde houve maior penetração do nematóide, excetuando-se a dose 15 kg.ha⁻¹, que teve o maior peso de parte aérea fresca e menor número de juvenis penetrados. A explicação seria de que continuou havendo crescimento vegetal, mas começou a observar efeito no controle do nematóide pelo número de propágulos da bactéria inoculados.

Palavras-chave: Alface, controle biológico, *Meloidogyne incognita*, rizobactérias.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 Aspectos econômicos do cultivo de alface.....	8
2.2 Botânica e grupos de alface.....	9
2.3 Gênero <i>Meloidogyne</i>	10
2.3.1 Morfologia do nematóide.....	10
2.3.2 Biologia do nematóide.....	11
2.3.3 Sintomatologia.....	11
2.3.4 Disseminação do nematóide.....	12
2.4 <i>Meloidogyne incognita</i> e a cultura da alface.....	12
2.5 Controle de fitonematóides por rizobactérias.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Local, instalação e execução do experimento em casa de vegetação.....	15
3.2 Obtenção do inóculo do fitonematóide.....	15
3.3 Condução e avaliação do experimento.....	15
3.4 Análise estatística.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	20

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa de maior importância no Brasil com uma área plantada de aproximadamente 35.000 ha. Seu cultivo é intensivo e o mercado de sementes de alface é estimado em torno de US\$ 2 milhões por ano (SALA; COSTA, 2005).

A alface predominante no Brasil é do tipo crespa, que lidera 70% do mercado. O tipo americana detém 15%, a lisa 10%, enquanto outras (vermelha, mimosa, entre outras) correspondem a 5% do mercado (SALA; COSTA, 2005).

É uma hortaliça que merece especial interesse, não só pela sua importância alimentar como também pelo seu valor nutracêutico, apresentando elevados teores de vitaminas e sais minerais, e com baixo teor calórico (CASALI et al., 1979; KATAYAMA, 1993; OSHE et al., 2001), sendo a hortaliça folhosa de maior aceitação pelo consumidor brasileiro (YURI, 2000). É a sexta hortaliça em importância econômica e oitava em termos de volume produzido (SOARES; CANTOS, 2006).

No cultivo intensivo das hortaliças, a ocorrência de doenças e pragas constitui um grande problema, reduzindo a produção e causando desabastecimento do mercado. Dentre os principais fitopatógenos que limitam a produtividade estão os fitonematóides, especialmente os formadores de galhas, que são capazes de infectar a maioria das plantas cultivadas, inclusive as hortaliças (TAYLOR et al., 1985).

A alface é classificada como um hospedeiro altamente suscetível a nematóides, principalmente os do gênero *Meloidogyne* (Chitwood) (CHARCHAR; MOITA, 1996). Cultivares de alface suscetíveis, quando infectadas por fitonematóides desse gênero, ficam atrofiadas, com reduzido sistema radicular e folhas amareladas (LORDELLO, 1984).

A utilização de cultivares resistentes a nematóides nem sempre é possível por falta de fontes de resistência para o melhoramento genético, pela falta de adaptabilidade dos cultivares resistentes a determinadas regiões ou épocas de plantio, ou pela quebra de resistência em condições de campo, como a resistência de tomateiros à *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, quebrada em temperaturas de solo superiores à 28°C, fato não muito raro de acontecer em nosso clima tropical.

A rotação de culturas é muito útil para o manejo de algumas espécies de nematóides que apresentam poucos hospedeiros, mas é complicada para outros, como *Meloidogyne* spp., que possuem ampla gama de hospedeiros.

O controle químico de nematóides geralmente não é recomendado por não ser muito efetivo, por ser caro, pelos resíduos que deixa nos alimentos e pela contaminação do ambiente.

Devido a estas desvantagens, existem constantes pressões por parte da sociedade, para que seu uso seja cada vez mais restrito e uma demanda, por parte dos agricultores, de produtos que sejam ao mesmo tempo atóxicos ao homem e animais, baratos e bastante efetivos no controle de nematóides fitoparasitas (FREITAS, 2001).

Neste contexto, insere-se o controle biológico como opção ecológica aos métodos tradicionais de controle. Controle biológico de fitonematóides em campo é pouco explorado, apesar dos estudos com vários microrganismos e principalmente com bactérias colonizadoras de raízes de plantas, denominadas rizobactérias, principalmente do gênero *Bacillus* (Rodrigues et al.) que vem apresentando bons resultados (FREITAS, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de penetração do fitonematóide *Meloidogyne incognita* em raízes de alface e o crescimento vegetal sob diferentes doses de um produto biológico à base de *Bacillus* sp..

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos econômicos do cultivo de alface

A alface, segundo Ryder e Witaker (1976) tem como provável centro de origem o sul da Europa e o oeste da Ásia. Depois de ser difundida por toda Europa, foi introduzida nas Américas, sendo então trazida ao Brasil, no ano de 1647, com a vinda dos portugueses.

Nos Estados Unidos, a alface é considerada o vegetal mais importante para ser consumido em forma de salada, tendo uma demanda per capita de 11,3 kg.ano⁻¹. Atualmente, mais de 95% da produção de alface nos Estados Unidos estão concentrados nos estados da Califórnia e Arizona, que participam com 70,67% e 28,51%, respectivamente, das receitas com alface produzida nos EUA (SANCHEZ, 2007). Nestes estados são cultivados aproximadamente 80 mil hectares, produzindo cerca de 3.480.000 toneladas.ano⁻¹, com produtividade média de 43,5 t.ha⁻¹ e movimentando uma receita de mais de 1,18 bilhões de dólares (USDA, 2009). Estes valores não computam a agregação de valor posterior com o processamento, “fresh cut”, e embalagens diferenciadas para o consumo final. Novos sistemas de cultivo estão propiciando um aumento na produção com uma redução de custo, além de possibilitar a produção da alface mais próxima dos centros consumidores, aumentando, assim, sua qualidade. Em se tratando de mercado brasileiro, a alface ocupa lugar de destaque entre as hortaliças folhosas, sendo a mais procurada pelos consumidores (SANCHEZ, 2007).

Na região do cinturão verde, nas proximidades da capital paulista, os municípios de Mogi das Cruzes, Biritiba Mirim, Salesópolis e Suzano, são os maiores produtores desta hortaliça. No ano de 2.000, estes municípios apresentaram uma produção diária de 1,5 milhões de pés, 141.000 t.ano⁻¹ e uma produtividade média de 30 t.ha⁻¹ em uma área de 4.700 ha. No ano de 2005, estas áreas totalizaram 3.400,6 ha cultivados, revelando uma redução de 27,65 % na área plantada (CARDOSO, 2000; INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA/COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL, 2009).

Os municípios paulistas de Piedade, Ibiúna e São Miguel Arcanjo formam outra região de destaque na produção de alface, onde são cultivados aproximadamente 4.000 ha (FELTRIM et al., 2009). No entanto, em levantamento do IEA/CATI (2009) verifica-se que o panorama destes municípios mudou, passando a ter em 2005, uma área cultivada de 330 ha, com redução de 92,33 % da ocupação do solo com a cultura, demonstrando uma provável substituição por outras hortaliças de maior rentabilidade.

Seu consumo “per capita” anual ainda é relativamente baixo sendo que na região metropolitana de São Paulo, este índice fica em torno de 3,1 kg. O volume comercializado no ano de 2008 foi de 25.762 toneladas, sendo que a alface crespa foi responsável pela produção de 7.309 toneladas, correspondendo a 28,37% do volume comercializado no estado (AGRIANUAL, 2009). No entanto, neste valor não é contabilizado o volume comercializado diretamente entre produtor e varejo, que é uma rota significativa de comercialização de alface.

2.2 Botânica e grupos de alface

A alface pertence à classe Magnoliopsida, ordem Asterales, família Asteraceae, subfamília Cichorioideae, tribo Lactuceae, e gênero *Lactuca* (WIKISPECIES, 2009). É uma planta anual e de porte herbáceo, caule reduzido e não ramificado com folhas grandes, lisas ou crespas, fechando-se ou não na forma de uma cabeça. Possui um sistema radicular pivotante de ramificações finas e curtas, podendo atingir até 60 cm de profundidade, explorando efetivamente de 15 a 20 cm do perfil do solo (CAMARGO, 1984; GOTO, 1998; MAROUELLI et al., 1994).

A alface possui elevado teor de beta caroteno que, no organismo humano, transforma-se em vitamina A, além de ser fonte de vitaminas do complexo B e C, de cálcio, sódio, magnésio e ferro (GOTO; TIVELLI, 1998). É a hortaliça folhosa de maior importância econômica para o Brasil, sendo consumida *in natura* na forma de salada (FIORINI et al., 2007).

Espécie típica de inverno desenvolve e produz melhor sob condições de temperaturas amenas. Seu ciclo é anual, encerrando a fase vegetativa quando a planta atinge o maior desenvolvimento das folhas. A fase reprodutiva consiste na emissão do pendão floral, sendo favorecida pelas épocas de elevadas temperaturas e dias longos (FILGUEIRA, 1982).

As cultivares comercialmente utilizadas podem ser didaticamente agrupadas, considerando-se as características das folhas, bem como o fato destas se reunirem ou não, formando uma cabeça repolhuda (FILGUEIRA, 2003). Assim, obtêm-se seis grupos ou tipos de alface:

Repolhuda-manteiga: apresentam folhas bem lisas, muito delicadas, de coloração verde-amarelada, aspecto amanteigado, formando uma típica cabeça compacta. A cultivar típica é a White Boston, que já foi considerada padrão de excelência em alface, porém ocorreu a diversificação nos hábitos de consumo. Atualmente vem sendo substituída por outras cultivares, como Brasil 303 e Carolina.

Solta-lisa: as folhas são macias, lisas e soltas, não havendo formação de cabeça. A cultivar típica é a tradicional Babá de Verão. Atualmente, há diversas cultivares, como Monalisa, Luisa e Regina.

Repolhuda-crespa (Americana): as folhas são caracteristicamente crespas, bem consistentes, com nervuras destacadas, formando uma cabeça compacta. É uma alface altamente resistente ao transporte e adequada para o preparo de sanduíches. A cultivar típica tradicional é Great Lakes, da qual há várias seleções. Atualmente, outras cultivares têm sido desenvolvidas no Brasil, ou introduzidas, sendo preferidas, exemplificando-se com Tainá, Madona e Lucy Brown.

Romana: as folhas são alongadas e consistentes, com nervuras bem protuberantes, formando cabeças fofas. Bons exemplos são as tradicionais cultivares Romana Branca de Paris e Romana Balão.

Mimosa: as folhas são delicadas e com aspecto arrepiado. Bons exemplos são as cultivares Salad Bowl e Greenbowl.

Solta-crespa: as folhas são bem consistentes, crespas e soltas, não formando cabeça. A cultivar típica é a norte americana Grand Rapids, tradicional. Há novas cultivares, exemplificando-se com Verônica, Marisa, Solaris e Vanessa.

2.3 Gênero *Meloidogyne*

Os nematóides formadores de galhas são endoparasitos sedentários. São parasitas obrigatórios e constituem o principal grupo de nematóides fitopatogênicos de importância econômica. Suas espécies são amplamente distribuídas e atacam quase todas as plantas cultivadas, como algodão, fumo, alface, batata, tomate, cenoura, soja, cana-de açúcar, café e frutíferas, causando perdas consideráveis na produção ou afetando a qualidade dos produtos (OTT, 2003).

2.3.1 Morfologia do nematóide

As fêmeas são globosas, piriformes, às vezes ovais ou esféricas, com 0,5-0,7 mm de diâmetro, apresentando parte anterior do corpo com formato cilíndrico. Tem coloração característica branca-perolada e brilhante. A vulva é subterminal, formando com o ânus, fasmídeos, linhas laterais e extremidade caudal, o períneo, de importância na identificação das espécies. O estilete é fino e com nódulos, algumas vezes, ligeiramente curvo no dorso. O aparelho reprodutor feminino está constituído de dois ovários, oviduto, espermateca, útero,

vagina e vulva. Devido à dilatação do corpo, as fêmeas ficam frequentemente com a parte posterior voltada para superfície da raiz, posição em que pode ocorrer a fertilização. No entanto, a partenogênese é muito comum. Os machos são cilíndricos, com 1-2 mm de comprimento, com cauda curta, bursa ausente e com espículos localizados na extremidade da cauda. Apesar do esôfago parecer normal, aparentemente eles não se alimentam (OTT, 2003).

2.3.2 Biologia do nematóide

O ciclo vital inicia-se com os ovos depositados pela fêmea numa matriz gelatinosa, secretada por glândulas localizadas no reto, denominada massa de ovos, que os protege. São colocados mais de 500 ovos, podendo a massa de ovos chegar a ter o tamanho do corpo da fêmea. O desenvolvimento embrionário resulta na formação de um juvenil (J1). A primeira ecdise ocorre no interior do ovo, formando o J2 que então eclode e irá procurar uma raiz para alimentar-se, guiado pelos exsudados da planta. O J2, vermiforme, cauda geralmente afilada, penetra normalmente próximo a capa protetora da raiz, na sua extremidade, movendo-se para o interior até o córtex. As primeiras punções do estilete são acompanhadas de secreções das glândulas esofagianas que causam um crescimento das células, levando à formação das "células gigantes" nutridoras ou sincício, pela destruição das paredes celulares, aumento do núcleo e mudanças citoplasmáticas. Ao mesmo tempo, uma intensa multiplicação celular (hiperplasia) causa o aumento em diâmetro das raízes, formando as galhas, que são sintomas da planta. Os juvenis, então, sofrem as outras ecdises, dando origem aos J3 e J4 e, finalmente, aos adultos macho e fêmea (OTT, 2003).

A duração do ciclo é extremamente variável para cada espécie de *Meloidogyne*, dependendo principalmente da temperatura, da susceptibilidade da planta hospedeira e das condições químicas e físicas do solo, mas pode-se dizer que ele dura 30 dias em média (OTT, 2003).

2.3.3 Sintomatologia

A doença causada pelas espécies de nematóides deste gênero é conhecida como "meloidoginose". Os sintomas na planta resultam de murcha nas horas mais quentes do dia, declínio, queda de folhas e sintomas de deficiência mineral. Nas raízes, que se desvitalizam e param de crescer, as galhas e rachaduras são visíveis. Às vezes, há formação de raízes laterais curtas, mas as galhas, de tamanhos variáveis, constitui-se no aspecto mais notado (OTT, 2003).

2.3.4 Disseminação do nematóide

A disseminação é feita por nematóides presentes no material vegetal, mudas enraizadas e solo aderido às máquinas e implementos agrícolas. Águas de enxurradas e de irrigação podem também transportar o nematóide (OTT, 2003).

2.4 *Meloidogyne incognita* e a cultura da alface

A alface, de acordo com Lordello (1988), é hospedeiro altamente suscetível aos nematóides das galhas *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (Treub) Chitwood, sendo responsáveis por perdas importantes, uma vez que reduzem a quantidade e a qualidade do produto colhido. Charchar e Moita (1996) evidenciaram que maior resistência tanto a *Meloidogyne incognita* como a *M. javanica* foi encontrada em cultivares de folhas crespas, destacando-se a cultivar Grand Rapids. Mendes (1998), avaliando resistência de 28 cultivares comerciais de alface às raças 1, 3 e 4 de *Meloidogyne incognita* e a *Meloidogyne javanica*, também encontrou que a cultivar de folhas crespas Grand Rapids foi uma boa fonte de resistência para ser utilizada em programas de melhoramento, devido à sua resistência a todas as raças e espécies testadas.

Além das espécies de fitonematóides *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* associadas à cultura da alface, Campos (1992) também associou *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. hapla* (Chitwood), *M. thamesi* (Chitwood), *Rotylenchulus reniformis* (Linford & Oliveira), *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & S. Stekhoven, *Aphelenchoides avenae* (Bastian), *Rotylenchus robustus* (de Man), *Longidorus africanus* (Merny) e *Helicotylenchus* spp. (Steiner).

Charchar (1991) observou que, em condições de campo, as cultivares de alface do tipo lisa, quando comparadas com as do tipo crespa, são mais afetadas por nematóides de galhas, principalmente quando cultivadas em solos infestados em épocas de temperaturas e umidade do solo mais elevadas.

Assim, a maioria das cultivares de alface utilizadas apresentam alta suscetibilidade aos nematóides de galhas, os quais causam engrossamentos nas raízes denominados de galhas (AZEVEDO et al., 2000; CHARCHAR; MOITA, 1996; LORDELLO; MARINI, 1974; MENDES, 1998). Plantas de alface, atacadas por nematóides, apresentam-se menos desenvolvidas, devido à densa formação das galhas no sistema radicular. As galhas obstruem a absorção de água e nutrientes, resultando em plantas amareladas, com cabeça de tamanho reduzido, pequeno volume foliar e sem valor para o consumo *in natura* (CHARCHAR;

MOITA, 1996). Portanto, o controle desses nematóides é imprescindível para o bom êxito de cultivo da alface, pois os nematóides de galhas podem causar perdas de até 100% na produção, dependendo da intensidade de infestação da área e da cultivar plantada (CHARCHAR, 1995). Perdas na produção agrícola causadas por nematóides fitoparasitas resultam em prejuízos para o produtor e elevação dos preços para o consumidor. Em termos mundiais, considera-se que essas perdas por nematóides sejam de aproximadamente 100 bilhões de dólares por ano (SASSER; FRECKMAN, 1987).

2.5 Controle de fitonematóides por rizobactérias

Os métodos mais usados para controlar fitonematóides têm sido o uso de nematicidas, variedades resistentes e rotação de culturas. Mas, como o gênero *Meloidogyne* apresenta ampla distribuição em todo país, polifagia e diferença biológica ligada ao parasitismo entre populações da mesma espécie, a implementação de programas de resistência varietal e rotação de culturas é dificultada (PIMENTA; CARNEIRO, 2002). Há também, uma pressão da sociedade no sentido da substituição dos atuais nematicidas por princípios ativos ou por táticas de controle ecologicamente mais recomendáveis. Esse fato tem levado à busca de métodos alternativos para o controle de fitonematóides, principalmente para os gêneros de maior importância como *Meloidogyne*. Assim, a supressão de nematóides por antagonistas observada em alguns solos e a interdição de alguns nematicidas proporcionaram o retorno de interesse no controle biológico (CARNEIRO, 1992).

As rizobactérias benéficas às plantas por promoverem seu crescimento e/ou atuarem no controle biológico de fitopatógenos são chamadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas ou PGPR, abreviatura de seu nome em inglês (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). Os benefícios causados por essas rizobactérias podem ser verificados em diversas culturas, dentre as quais se destaca a alface (FREITAS et al., 2003). A promoção de crescimento pode ser o resultado de diversos mecanismos, a saber: controle biológico pela competição por nutrientes com o patógeno, produção de sideróforos e antibióticos (RAMAMOORTHY et al., 2001), resistência induzida a doenças (NANDAKUMAR et al., 2001), promoção de crescimento diretamente pela produção de fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de N₂ (ANTOUN et al., 1998) ou solubilização de P (CHABOT et al., 1996). Daí, o interesse por suas funções na rizosfera ter aumentado significativamente nas últimas décadas (CHABOT et al., 1996; FREITAS et al., 2003; GASONI et al., 2001).

Hoffmann-Hergarten e colaboradores (1998) verificaram que *Bacillus cereus* (Frankland & Frankland), *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) e *Pseudomonas* sp (Migula). causaram

redução significativa de índice de galhas de *Meloidogyne incognita* em alface e tomate. Os fitonematóides *Rotylenchulus reniformis* e *Tylenchorhynchus latus* (Allen) tiveram suas populações reduzidas no campo pela adição de *Bacillus* sp. na cultura do algodoeiro similarmemente ao alcançado pelo uso do nematicida fenamifós. Já canteiros tratados com o actinomiceto *Streptomyces* sp. apresentaram produção e controle dos nematóides maiores do que o controle não tratado, porém menores do que o tratamento com *Bacillus* sp. (ANTER et al., 1995).

A ação de rizobactérias sobre os fitonematóides pode ocorrer tanto de forma direta, sobre a eclosão de juvenis e a mobilidade desses e de adultos ectoparasitos, como de forma indireta pela indução de resistência sistêmica da planta hospedeira, pela modificação dos exsudatos radiculares, sua atratividade aos nematóides e a penetração desses nas raízes (HASKY-GÜNTHER et al., 1998; OOSTENDORP; SIKORA, 1990; SIKORA; HOFFMANN-HERGARTEN, 1992; STIRLING, 1991). Algumas rizobactérias produzem enzimas e metabólitos tóxicos. De fato, cerca de 1% dos isolados testados por Becker e colaboradores (1988) produziram substâncias que causaram inibição completa ou parcial do movimento dos juvenis de *M. incognita*, e destes, 20% reduziram também o número de galhas em raízes de pepino. Entretanto, o sucesso desses agentes de biocontrole depende da colonização da rizosfera das plantas e das interações entre esses microrganismos introduzidos e a microbiota nativa (ZHANG et al., 2000).

As rizobactérias têm uma série de vantagens sobre os nematicidas ou mesmo sobre outros agentes de controle biológico: 1) fáceis de serem produzidas em massa, 2) fácil armazenamento, 3) adaptáveis à tecnologia de formulação e 4) não requerem manipulação genética (SIKORA; HOFFMANN-HERGARTEN, 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, instalação e execução do experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido na casa de vegetação e no Laboratório de Nematologia Agrícola do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia-MG, no período de janeiro a maio de 2009.

A semeadura da alface cultivar Grand Rapids TBR foi realizada em janeiro de 2009, em bandeja de isopor composta por 200 células, contendo substrato agrícola Bioplant[®]. Em cada célula foi colocada uma semente. Após 30 dias, as plântulas foram repicadas para outras bandejas de isopor com capacidade de 72 células e profundidade de 10 cm.

O experimento foi constituído de 5 tratamentos e 10 repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma planta de alface. Os tratamentos foram diferentes doses do produto Nemix[®] à base de *Bacillus* sp.: 0 kg.ha⁻¹ (testemunha); 5 kg.ha⁻¹; 8 kg.ha⁻¹; 10 kg.ha⁻¹ e 15 kg.ha⁻¹.

A quantidade do produto aplicada em cada planta levou em consideração para essa cultivar, a densidade de 160.000 plantas.ha⁻¹. O preparo de calda do produto biológico foi para 10 plantas (repetições) de cada tratamento em que o volume foi de 50 mL, e aplicou-se 5 mL por planta no mesmo dia em que foi realizada a repicagem.

3.2 Obtenção do inóculo do fitonematóide

Raízes de tomateiro infectadas por *Meloidogyne incognita* foram processadas pela técnica de Boneti e Ferraz (1981). A suspensão de ovos obtida foi calibrada para conter 2500 ovos.mL⁻¹. Uma semana após a repicagem, cada plântula recebeu 2 mL da suspensão distribuídos em dois orifícios de 1 cm de profundidade feitos no substrato. As bandejas permaneceram na casa de vegetação.

3.3 Condução e avaliação do experimento

Após 25 dias da inoculação, foi realizada a técnica da coloração de nematóides em tecido vegetal (BYRD et al., 1983). Essa técnica consistiu em lavar bem as raízes retirando todo o solo, sem danificá-las; em seguida foram cortadas em pedaços de 1 a 2 cm e adicionadas a um copo de Becker (capacidade para 150 mL) contendo 50 mL de água de torneira. Aos 50 mL de água foram adicionados 20 mL de água sanitária comercial (NaOCl). Os fragmentos

foram deixados nessa solução por 4 min. Após esse período, as raízes foram retiradas da solução e lavadas em água corrente por 30 a 45 s com a finalidade de retirar resíduos de NaOCl. Os pedaços de raízes permaneceram em um copo de Becker contendo água de torneira durante 15 min. A água foi drenada e as raízes cortadas foram transferidas para um copo de Becker contendo 30 mL de água + 1 mL do corante (composição do corante: 3,5 g de fucsina ácida, 250 mL de ácido acético e 750 mL de água destilada). Houve o aquecimento até o ponto de fervura, contou-se 30 s e em seguida foi realizado o resfriamento à temperatura ambiente. O excesso do corante foi removido por lavagem em água corrente. As raízes foram colocadas em 20 a 30 mL de glicerina, conforme a quantidade de raízes. Para a leitura dos nematóides penetrados, os segmentos de raízes foram pressionados entre duas lâminas microscópicas para observação no microscópio ótico e determinação do número de nematóides no interior do tecido vegetal.

A parte aérea foi pesada para obtenção da massa fresca e em seguida acondicionada em sacos de papel contendo furos. Os sacos foram colocados na estufa à 60°C durante 72 h ou até peso constante. Após esse período, a parte aérea foi novamente pesada para obtenção da massa seca.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se do software SISVAR (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados do número de juvenis penetrados na raiz, peso da parte aérea fresca e peso da parte aérea seca obtidos estão na Tabela 1. Conforme a análise de variância, não houve diferença significativa entre as doses de Nemix[®] e o número de juvenis penetrados e nem entre as doses de Nemix[®] e a parte aérea seca. Já entre as doses de Nemix[®] e a parte aérea fresca houve diferença significativa. Em alface, Gasoni e seus colaboradores (2001) trabalhando com rizobactérias obtiveram respostas positivas apenas em relação à massa da matéria fresca da parte aérea.

Comparando as massas de parte aérea fresca da testemunha com os demais tratamentos, observa-se que as doses de 5 e 15 kg.ha⁻¹ proporcionaram maior desenvolvimento vegetal da alface.

Hoffmann-Hergarten e colaboradores (1998) verificaram que *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas* sp. causaram redução significativa de índice de galhas de *M. incognita* em alface e tomate.

Tabela 1- Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* penetrados, massa de parte aérea fresca e seca da alface, após 25 dias da inoculação de 5.000 ovos. Uberlândia, UFU, maio de 2009.

Doses de Nemix (kg.ha ⁻¹)	Nº de juvenis penetrados	Parte aérea fresca (g)	Parte aérea seca (g)
0	50,4	1,66 b*	0,19
5	91,1	2,59 a	0,25
8	84,2	2,35 ab	0,25
10	82,4	1,95 ab	0,21
15	54,7	2,75 a	0,28
CV (%)	70,32	29,41	33,23

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pelo Nemix[®] ser um produto biológico a base de rizobactérias, essas possuem o papel principal de promover o crescimento vegetal, aumentando o sistema radicular e conseqüentemente, aumentando o número de locais de entrada de nematóides.

Os pesos da parte aérea fresca vão aumentando conforme a dose sem que a quantidade de rizobactérias afete a penetração do nematóide. Já na dose 15 kg.ha⁻¹ que apresenta o maior peso de parte aérea fresca ocorreu redução no número de juvenis penetrados (Figura 1). De acordo com Sikora (1988) as rizobactérias incluem-se entre os organismos antagonistas mais propícios ao manejo da população de fitonematóides por possuírem a capacidade de limitar a

penetração dos nematóides nas raízes. Provavelmente, embora tenha ocorrido o crescimento vegetal, houve também mais rizobactérias que iniciaram o efeito de inibição na penetração do nematóide.

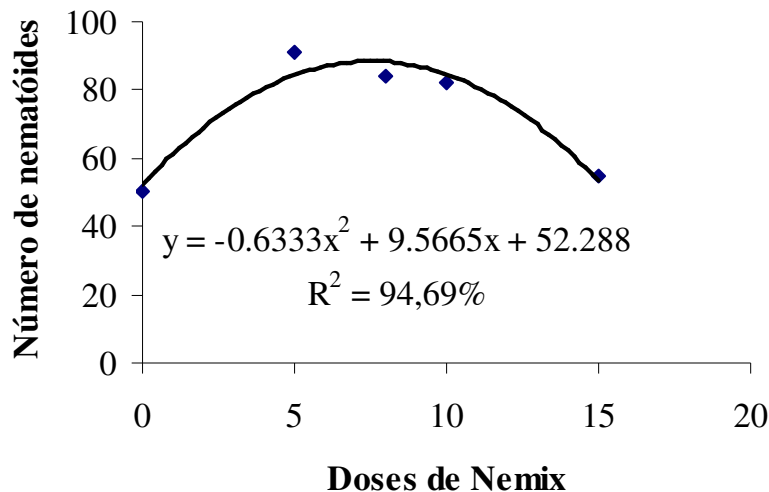


Figura 1 – Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* penetrados nas raízes de alface nas diferentes doses do produto Nemix[®] à base de *Bacillus* sp. Uberlândia, UFU, 2009.

Segundo Maciel e Ferraz (1996), o método biológico para controle de nematóides pode acontecer pela paralisação do ciclo ou, pelo menos, pela redução da capacidade reprodutiva do parasita. Além disso, a transformação dos exsudatos radiculares em subprodutos pela ação dos microrganismos pode fazer com que o nematóide não reconheça o estímulo quimiotrópico e continue movimentando-se no solo até morrer (FREITAS, 2001). Esse mesmo autor também cita que as rizobactérias ou seus metabólitos desencadeiam reações de hipersensibilidade nas células vegetais, impedindo que as fêmeas dos nematóides consigam energia suficiente para produzir ovos. Além disso, também já foi relatado que antagonistas no solo podem degradar a massa gelatinosa que envolve os ovos, reduzindo sua proteção, principalmente pelo aumento da desidratação (ORION; KRITZMAN, 1991). Oka et al. (1993) observaram a atividade nematicida do *Bacillus cereus* sobre ovos e juvenis, e a exposição do nematóide a essa bactéria inibiu a penetração do parasita nas raízes de tomateiro.

Trabalhos com doses maiores de Nemix[®] devem ser feitos para verificar maiores efeitos na redução de penetração do nematóide nas raízes de alface.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que nas doses testadas de Nemix[®] houve promoção do crescimento vegetal de alface, mas não ocorreu redução de penetração de juvenis infectivos nas raízes.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL 2009 - Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2009. p.155.
- ANTER, E.A., ABDELGAWAD, M.M.; ALI A.H. Effects of fenamiphos and biocontrol agents on cotton growing in nematode-infested soil. **Anzeiger fur Schaedlingskunde**, Berlin, v.68, p.12-14, 1995.
- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacterian on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.204, p.57-67, 1998.
- AZEVEDO, S.M.; MALUF, W.R.; GOMES, L.A.A.; OLIVEIRA, A.C.B.; FREITAS, J.A.; ANDRADE JÚNIOR, V.C.; JESUS, N.; BRAGA, L.R.; LICURSI, V. Herança da resistência ao nematóide de galha em alface. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 40., 2000, São Pedro. **Anais...** São Pedro: SOB, p.629-630.
- BECKER, J. O.; ZAVALETA-MEJIA, E.; COLBERT, S. F.; SCHROTH, M. N.; WEINHOLD, A. R. HANCOCK, J. G. e VAN GUNDY, S. D. Effects of rhizobacteria on root-Knot nematodes and gall formation. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, p.1466-1469, 1988.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.6, n.3, p.533, 1981.
- BYRD Jr., D.W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, v.15, n.1, p.142-143, 1983.
- CAMARGO, L. de S. **As hortaliças e seu cultivo**. 2ª ed. Campinas: Fundação Cargill, 1984. 448p.
- CAMPOS, V. P. Danos e prejuízos causados por fitonematóides. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.172, p.14-15, 1992.
- CARDOSO, F. Alface atinge limite de excelência. **Frutas e Legumes**, São Paulo, v.1, n.6, p.7-11, 2000.
- CARNEIRO, R. M. D. G. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.27, p.113-121, 1992.
- CASALI, V.W.D.; SILVA, R.F.; RODRIGUEZ, J.J.V.; SILVA, J.F. da; CAMPOS, J.P. de. **Anotações de aula teórica sobre produção de alface**. Viçosa: UFV, 1979. mimeografado. 21p.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M.P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Plant and Soil**, The Hague, v.184, p.311-321, 1996.

CHARCHAR, J.M. Comportamento de cultivares de alface à infecção por nematóides de galhas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.9, p.35, 1991.

CHARCHAR, J.M. Meloidogyne em hortaliças. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA TROPICAL; CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 19; ENCONTRO ANUAL DA ORGANIZAÇÃO DOS NEMATOLOGISTAS DA AMÉRICA TROPICAL, 27., 1995, Rio Quente. Programa e **Anais...** Rio Quente: SBN/ONTA, 1995. p.149-153.

CHARCHAR, J.M.; MOITA, A.W. Reação de cultivares de alface à infecção por mistura populacional de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em condições de campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.14, n.2, p.185-189, 1996.

FELTRIM, A. L.; CECÍLIO FILHO, A. B.; REZENDE, B. L. A.; BRANCO, R. B. F. Produção de alface-crespa em solo e em hidroponia, no inverno e verão, em Jaboticabal – SP. **Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.9-15, 2009.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. **Anais...**, UFSCar, São Carlos, SP, Julho, 2000. p.255-258.

FILGUEIRA, F.A.R.; **Manual de olericultura**: cultura e comercialização de hortaliças. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1982. 338p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2003. 402p.

FIORINI, C.V.A.; GOMES, L.A.A.; LIBÂNIO, R.A.; MALUF, W.R.; CAMPOS, V.P.; LICURSI, V.; MORETTO, P.; SOUZA, L.A.; FIORINI, I.V.A. 2007. Identificação de famílias F2:3 de alface homozigotas resistentes aos nematóides das galhas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.25, p.509-513, 2007.

FREITAS, L. G., 2001. **Rizobactérias versus nematóides**. Disponível em <http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf> acesso em: 14 de janeiro de 2009.

FREITAS, S.S.; DE MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n.1, p. 61-70, 2003.

GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; YOSSEN, V.; ZUMELZU, G.; BABBITT, S.; KAHN, N. Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). **Journal of Plant Diseases and Protection**, Braunschweig, v.108, p.530-535, 2001.

GOTO, R. A cultura de alface. In: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido**: condições subtropicais. São Paulo: Unesp, 1998. p. 137-159.

GOTO, R.; TIVELLI, S.W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido**: Condições Subtropicais. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, p.15 -159, 1998.

HASKY-GÜNTHER, K.; HOFMANN-HERGARTEN, S.; SIKORA, R.A. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systematically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v.21, n.6, p.511-517, 1998.

HOFFMANN-HERGARTEN, S.; GULATI, M.K.; SIKORA, R.A. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Braunschweig, v.105, n.4, p. 349-358, 1998.

IEA-CATI. Levantamento de safra. 2001-2005. **Cultura de alface**. Disponível em <http://www.iea.sp.gov.br/out/mapa.php> acesso em: 30 de julho de 2009.

KATAYAMA, M. Nutrição e adubação de alface, chicória e almeirão. In: FERREIRA, M.E.; CASTELLANE, P.D.; CRUZ, M.C.P. (ed.). **Nutrição e adubação de hortaliças**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 141-148.

KLOPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growthpromoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.1020-1024, 1981.

LORDELLO, L.G.E.; MARINI, P.R. Alguns nematóides parasitos de plantas no Rio Grande do Sul. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.49, p.15-18, 1974.

LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8.ed. São Paulo: Nobel, p.314, 1984.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 6. ed. São Paulo: Nobel, 1988. 314p.

MACIEL, S.L.; FERRAZ, L.C.C.B. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.53, p.956-960, 1996.

MAROUELLI, W. A.; SILVA, W.L.C.S.; SILVA, H.R. **Manejo da irrigação em hortaliças**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1994. 60p.

MENDES, W.P. **Hospedabilidade e resistência de cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) aos nematóides das galhas *Meloidogyne incognita* (raças 1, 3 e 4) e *Meloidogyne javanica***. 1998. 43f. (Tese mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.33, p.603-612, 2001.

OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. et al. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.3, p.115-126, 1993.

OOSTENDORP, M.; SIKORA, R.A. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Revue de Nématologie**, Bet Dagan, v.14, p.269-274, 1990.

ORION, D.; KRITZMAN, G. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. **Revue de Nématologie**, Bet Dagan, v.14, p.481-483, 1991.

OSHE, S.; OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, M.A.N.; PEDROSA, M.W.; GARCIA, N.C.; DOURADO-NETO, D.; MANFRON, P.A.; DOS SANTOS, O.S. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.1, p. 181-185, 2001.

OTT, A. P. **Parasitologia Agrícola “A”**. 2003. Disponível em <http://www.ufrgs.br/agrofitossan/AGR04002/nemgalha.htm#Introdu%E7%E3o> acesso em: 28 de julho de 2009.

PIMENTA, C.A.N.; CARNEIRO, R.M.D.G. Controle de *Meloidogyne javanica* por *Pasteuria penetrans* na cultura da alface: primeiro ensaio. **Nematologia Brasileira**, Brasília, DF, v.26, n.1, p.67-75, 2002.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RGGUCHANDER, T.; PRACKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Oxford, v.20, p.1-20, 2001.

RYDER, E.J.; WHITAKER, T.N. Lettuce. In: SIMMONDS, N.W. (ed.). **Evolution of Crop Plants**. New York: Longman Group Limited, Ed. N.E. Simmonds, 1976. p. 39-41.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. ‘Piraroxa’: Cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.23, n.1, p. 158-159, 2005b.

SANCHEZ, S.V. **Avaliação de cultivares de alface crespa produzidas em hidroponia tipo NFT em dois ambientes protegidos em Ribeirão Preto (SP)**. 2007. Disponível em <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pv/m/2802.pdf> acesso em: 29 de julho de 2009.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. (ed.). **Vistas on Nematology**. Maryland: Society of Nematologists, 1987, p.7-14.

SIKORA, R. A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Medical Faculty Landbouww**, Gent, v. 2, n.53, p.867-878, 1988.

SIKORA, R.A.; HOFFMANN-HERGARTEN, S. Importance of plant health-promoting rhizobacteria for the control of soil-borne fungal disease and plant parasitic nematodes. **Arabian Journal of Plant Protection**, Beirut, v.10, n.1, p.48-53, 1992.

SOARES, B.; CANTOS, G. A. Avaliação microbiológica de alface (*Lactuca sativa*) comercializada em Florianópolis- Santa Catarina, em relação à presença de coliformes totais e fecais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 147, dez. 2006.

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

TAYLOR, S. G.; BALTENSPERGER, D. D.; DUNN, R. A. Interaction between six warm season legumes and three species of root-knot nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, v.17, n.3, p.367-370, 1985.

USDA: Economic Research Service. **Estatísticas da Commodity-alface**. Disponível em www.loc.gov/rr/news/stategov/ca-gov.html acesso em: 30 de julho de 2009.

WIKISPECIES. Classificação taxonômica da cultura de alface. Disponível em <http://species.wikimedia.org/wiki/Lactuca> acesso em: 30 de julho de 2009.

YURI, J.E. **Avaliação de cultivares de alface americana em duas Épocas de cultivo em dois locais do Sul de Minas Gerais**. 2000. 51f. Dissertação (mestrado em fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

ZHANG, F.; ZHANG, P.; CHEN, X. Factors affecting colonization of introduced microorganisms on plant roots. **The Journal of Applied Ecology**, Oxford, v.11, n.6, p.951-953, 2000.