

INFLUÊNCIA DO NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO
Heterorhabditis baujardi isolado LPP7 NA EMBRIOGÊNESE,
ECLOSÃO DOS JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO, INFECÇÃO E
NA PROLIFICIDADE DO NEMATÓIDE FITOPARASITA *Meloidogyne*
mayaguensis (TYLENCHIDA: MELOIDOGINIDAE)

THIAGO DE FREITAS FERREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2010

INFLUÊNCIA DO NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO
Heterorhabditis baujardi isolado LPP7 NA EMBRIOGÊNESE,
ECLOSÃO DOS JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO, INFECÇÃO E
NA PROLIFICIDADE DO NEMATÓIDE FITOPARASITA *Meloidogyne*
mayaguensis (TYLENCHIDA: MELOIDOGINIDAE)

THIAGO DE FREITAS FERREIRA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal.”

Orientador: Prof. Ricardo Moreira de Souza

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2010

DEDICO E OFEREÇO

Aos meus pais, Cosme e Ana
e à minha namorada, Marina.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amparo ao longo de toda minha vida;
À minha família, pelo apoio, confiança e compreensão ao longo destes anos;
A UENF, pela oportunidade de realização do curso;
Aos meus orientadores, Ricardo e Cláudia, pela confiança, incentivo, orientação e formação;
Aos professores das disciplinas cursadas, pelos conhecimentos transmitidos;
Aos colegas do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia;
Aos integrantes do laboratório de Nematologia, pela amizade e horas compartilhadas;
A FAPERJ, pela concessão da bolsa;
À minha irmã Sabrine e ao meu cunhado Luiz Henrique, pelo exemplo de dedicação aos estudos;
À minha namorada, pelo apoio e compreensão;
Aos amigos Adilson, Adriano, Diogo, Dulce, Lucas e Juliana, pela grande amizade;
E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

vii

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	4
3. Objetivo do trabalho.....	19
4. Trabalhos.....	20
4.1 Influência do nematóide entomopatogênico <i>Heterorhabditis baujardi</i> isolado LPP7 (NEMATODA: RHABDITIDA) Phan, Subbotin, Nguyen e Moens, 2003 na embriogênese e eclosão dos juvenis de segundo estágio do nematóide fitoparasita <i>Meloidogyne mayaguensis</i> (TYLENCHIDA: MELOIDOGINIDAE) Rammah e Hirschmann,1988.....	20
Resumo.....	20
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Materiais e Métodos.....	23
Resultados e Discussão.....	25
Referências Bibliográficas.....	30
4.2 Avaliação da prolificidade e infecção de J2 de <i>M. mayaguensis</i> na presença de <i>H. baujardi</i> LPP7 em raízes de tomateiro.....	32
Resumo.....	32
Abstract.....	33

Introdução.....	34
Materiais e Métodos.....	35
Resultados e Discussão.....	36
Referências Bibliográficas.....	41
5. Resumo e Conclusões.....	44
Referências Bibliográficas.....	45

RESUMO

FERREIRA, Thiago Freitas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2010. **INFLUÊNCIA DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis baujardi* LPP7 NA EMBRIOGÊNESE, ECLOSÃO DOS JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO, INFECÇÃO E NA PROLIFICIDADE DO NEMATÓIDE FITOPARASITA *Meloidogyne mayaguensis* (TYLENCHIDA: MELOIDOGINIDAE)**. Orientador: Prof. Ricardo M. Souza. Co-Orientadora: Prof^a Cláudia Dolinski.

Nos últimos anos, tem-se investigado o uso de nematóides entomopatogênicos (NEPs) e suas bactérias simbiotes como uma estratégia de controle de fitonematóides. No entanto, são necessários mais estudos que investiguem em que fase(s) do desenvolvimento do fitonematóide ocorre o efeito dos NEPs, bem como os mecanismos envolvidos. Para verificar a influência do NEP *H. baujardi* LPP7 na embriogênese do fitonematóide *M. mayaguensis*, ovos deste nematóide no estágio de duas células foram mantidos por 312 horas em água na presença de juvenis infectantes (JIs) de *H. baujardi* LPP7, tendo-se avaliado o tempo necessário para os embriões se desenvolverem até o estágio de juvenil de segundo-estádio (J₂). Para avaliar o efeito de JIs sobre a eclosão de J₂, ovos contendo J₂ ativos foram mantidos em água na presença de JIs por 180 horas, tendo-se avaliado a eclosão acumulada ao longo do tempo. Em ambos os experimentos, ovos de *M. mayaguensis* mantidos em água serviram como testemunha. Para avaliar o efeito de JIs sobre a infecção por J₂, mudas de tomateiro foram inoculadas com 1000 JIs, e 24 horas depois foram inoculadas

500 J₂, tendo-se avaliado a infecção cinco dias após através da extração e contagem dos J₂ presentes nas raízes. Plantas inoculadas somente com J₂ serviram como testemunha. Para avaliar a influência de JIs sobre a prolificidade de fêmeas de *M. mayaguensis*, plântulas de tomate foram inoculadas com 500 J₂ e sete dias posteriores aplicados 1000 JIs, tendo-se avaliado 45 dias depois o número médio de ovos/massa de ovos produzida pelas fêmeas. Plântulas inoculadas somente com J₂ serviram como testemunha. Avaliou-se também o efeito da reinoculação de JIs 17 dias após a inoculação com os J₂ de *M. mayaguensis*. Os resultados demonstraram que *H. baujardi* LPP7 e/ou sua bactéria simbiótica (*Photorhabdus* sp.) não afetaram a embriogênese de *M. mayaguensis*, pois o tempo médio deste processo até a fase de J₂ não sofreu alteração, em relação à testemunha. Acredita-se que a baixa permeabilidade dos ovos durante a embriogênese impediu a penetração de metabólitos de *Photorhabdus* sp. liberados no meio (água). Quanto à eclosão de J₂, verificou-se atraso na eclosão acumulada no período de 24 a 72 horas, durante as quais houve abundância de *Photorhabdus* sp. liberados pelos JIs na água onde os ovos de *M. mayaguensis* foram incubados. Acredita-se que este atraso deu-se pela percepção de metabólitos bacterianos pelos J₂, provocando-lhes a interrupção temporária do processo de eclosão. Ao longo das horas seguintes, a redução do número de UFCs da bactéria na água coincidiu com a recuperação na eclosão dos J₂. Os JIs de *H. baujardi* LPP7 interferiram negativamente na infecção das raízes de tomateiro por J₂ de *M. mayaguensis*, bem como reduziram a prolificidade das fêmeas. Em conclusão, *H. baujardi* LPP7 e/ou sua bactéria simbiótica (*Photorhabdus* sp.) apresenta um antagonismo significativo a diferentes fases e processos do ciclo-de-vida de *M. mayaguensis*. Este antagonismo é provavelmente mediado pelos metabólitos bacterianos liberados por *Photorhabdus* sp. Este trabalho confirma o potencial do uso de NEPs no controle biológico de *Meloidogyne mayaguensis* em pequenas áreas ou plantios, devendo-se avançar nos estudos da metodologia de aplicação (época, dosagens, métodos) dos NEPs.

Palavras-chave: *Heterorhabditis baujardi* LPP7, eclosão, infecção, prolificidade, *Meloidogyne mayaguensis*.

ABSTRACT

FERREIRA, Thiago Freitas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2010. **INFLUENCE OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES *Heterorhabditis baujardi* ISOLATED LPP7 ON EMBRYOGENESIS, OUTBREAK OF JUVENILE SECOND STAGES, INFECTION AND PROLIFICACY OF *Meloidogyne mayaguensis*.** Adviser: Prof. Ricardo M. Souza. Co-adviser: Prof^a Cláudia Dolinski.

In recent years, has been investigating the use of entomopathogenic nematodes (EPNs) and their symbiotic bacteria as a strategy to control plant parasitic nematodes. However, it is necessary more studies in which phase(s) of development nematode is the negative effect of EPNs, and the mechanisms involved. To check the influence of EPN *H. Baujardi* LPP7 in embryogenesis of the nematode *M. mayaguensis*, eggs of this nematode in stage of two cells were maintained for 312 hours in water presence of infective juveniles (IJs) of *H. Baujardi* LPP7, having been evaluated the time required for embryogenesis to develop the stage juvenile second stage (J₂). To evaluate the effect on the IJs hatching eggs containing J₂ assets were kept in water presence of IJs for 180 hours and it was rated the hatching accumulated over time. In both experiments, eggs of *M. mayaguensis* kept in water served as control. To evaluate the effect of IJs on infection J₂, tomato plant were inoculated with 1000 IJs, and 24 hours later were inoculated 500 J₂, and it was evaluated days after infection by

harvesting and counting J_2 present in the roots. Plants inoculated with J_2 only served as witness. To assess the influence of IJs on the prolificacy of female *M. mayaguensis*, tomato plants were inoculated with 500 J_2 and seven days later with 1000 IJs and it was evaluated 45 days after the average number of eggs per egg mass produced by females. Plants inoculated with J_2 only served as a witness. We also evaluated the effect of liquor IJs 17 days after inoculation with J_2 of *M. mayaguensis*. The results showed that *H. baujardi* LPP7 and/or their symbiotic bacteria (*Photorhabdus* sp.) Did not affect the embryogenesis of *M. mayaguensis* because the average time this process until the phase of J_2 has not changed the control. It is believed that the low permeability of the eggs during embryogenesis prevented the penetration of metabolites *Photorhabdus* sp. released into the environment (water). The emergence of J_2 , there was a delay in the onset accumulated within 24 to 72 hours, during which there were plenty of *Photorhabdus* sp. released by IJs in the water where the eggs of *M. mayaguensis* were incubated. It is believed that this delay was due to the perception of the bacterial metabolites J_2 , causing them to temporary interruption of the process of hatching. By over the next few hours, reducing the number of CFUs of bacteria in water coincided with the recovery from the outbreak of J_2 . The IJs *H. baujardi* LPP7 had worse effect on infection of tomato roots by J_2 of *M. mayaguensis* and reduced prolificacy of females. In conclusion, *H. baujardi* LPP7 and/or their symbiotic bacteria (*Photorhabdus* sp.) display a significant antagonism in different stages and processes of the cycle-life of *M. mayaguensis*. This antagonism is probably mediated by the bacterial metabolites released by *Photorhabdus* sp. This work confirms the potential use of EPNs in biological control of *Meloidogyne* sp. in small areas or plantations, should be further study of the application method (time, dosages, methods) of EPNs.

Keywords: *Heterorhabditis baujardi* LPP7, outbreak, infection, prolificacy, *Meloidogyne mayaguensis*.

1 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de nematoides são importantes na agricultura, algumas pelos danos causados a produção sendo considerados fitonematóides e outros por causarem doença e morte em diferentes espécies de artrópodes, sendo conhecidos como nematóides entomopatogênicos. Nematoides fitoparasitas pertencem a um dos seis grupos tróficos do Filo Nemata, um grupo de invertebrados muito abundante, diversificado e amplamente distribuído pelas diversas regiões do planeta.

No Brasil, o principal problema fitossanitário da cultura da goiabeira (*Psidium guajava* Linnaeus, 1753) é o declínio, causado por *Meloidogyne mayaguensis* Hammah e Hirschmann, 1988, (Ordem: Família) associado a *Fusarium solani* (Mart). De acordo com Pereira *et al.* (2009), o impacto causado a produtores de goiaba em cinco estados brasileiros foi estimado em 112,7 milhões de reais até o ano de 2008, aos quais se acrescentam o desemprego de 3.703 trabalhadores rurais em tempo integral devido ao declínio e morte dos pomares. Esta doença causa acentuada queda de produtividade e morte das plantas em médio prazo. Nos últimos anos, muitas comunidades rurais brasileiras sofreram o impacto desta doença. Diversos pomares foram dizimados ou estão infestados nos pólos frutícolas próximos a Juazeiro (BA) e Petrolina (PE) e em mais de dez estados brasileiros (Anônimo, 2006). No estado do Rio de Janeiro, esta doença afetou seriamente as agroindústrias do município de São João da Barra (Lima *et*

al., 2003) e já afeta Cachoeiras de Macacu, principal produtor de goiabas para mesa (Kawae, 2006).

Ações preventivas, como o não compartilhamento de caixas, mudas, utensílios e maquinários, são a melhor alternativa para evitar-se a infestação da propriedade por *M. mayaguensis*. Em nível regional, Carneiro *et al.* (2001) sugerem medidas quarentenárias urgentes devido à alta taxa de multiplicação e virulência deste nematoide a diferentes hospedeiros portadores de genes de resistência. Souza *et al* (2006) e Gomes (2007) relataram um relativo sucesso no convívio com *M. mayaguensis* através do manejo nutricional correto do pomar infestado associado à aplicação de matéria orgânica no solo.

Uma possibilidade de sucesso contra esses nematoides está no melhoramento vegetal e no uso de porta-enxerto resistente (Campos *et al.*, 1990; Campos 1997). Entretanto, até o presente, não existem genótipos comerciais de goiabeiras resistentes a *M. mayaguensis*. e iniciativas visando o melhoramento de plantas para resistência a esse nematoide estão em andamento na UENF, e em outros grupos de pesquisa.

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm explorado o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) (Rhabditida) e/ou suas bactérias simbiontes como antagonistas de nematoides fitoparasitas. Entretanto, em geral esses trabalhos não explicam os mecanismos envolvidos na interação entre os dois nematoides (Jaddale *et al*, 2002; Somasekhar *et al.*, 2002; Lewis e Gaugler, 2005). Em estudos envolvendo ovos e juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. mayaguensis*, *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen e Moens, 2003 LPP7 e *Steinernema feltiae* Filip' Jev, 1934, Molina (2007) observou o efeito negativo dos NEPs sobre os fitonematóides, como a diminuição do número de galhas radiculares. Segundo Ferreira *et al.* (2009a), diferentes concentrações de ovos de *M. mayaguensis* depositados em areia induziram a liberação de bactérias simbiontes de *H. baujardi* LPP7. Entretanto, para que se comprove o efeito negativo de NEPs e suas bactérias simbiontes sobre *M. mayaguensis*, e a viabilidade desta interação como estratégia de controle, são necessários mais estudos que comprovem como ocorre essa interação e em que fase(s) do desenvolvimento do fitoparasita ocorre o efeito negativo do NEP. De fato, não se sabe ao certo se os NEPs afetariam a embriogênese, a eclosão de J₂, a infecção

da raiz ou a prolificidade de *M. mayaguensis*, ou a combinação de alguns desses processos. O presente trabalho procurou investigar precisamente estes aspectos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Meloidogyne*

Nematoides do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887 são muito abundantes e diversificados, agrupando os nematoides formadores de galhas. Mais de 80 espécies são reconhecidas (Carneiro *et al.*, 2000). Esses fitonematóides são de difícil controle e fácil disseminação, sendo parasitas de culturas de grande importância econômica, resultando em prejuízos que vão desde a destruição de mudas até a redução drástica da produtividade, causando grande impacto econômico na agricultura (Melo, 1995).

Os nematoides formadores de galhas são parasitas obrigatórios de vegetais, e possuem como característica o dimorfismo sexual. As diferenças gerais na forma do corpo entre machos e fêmeas, tais como fêmeas arredondadas e machos vermiformes, são estabelecidas durante o desenvolvimento pós-embrionário do nematoide (Eisenback e Triantaphyllou, 1991). O desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J₁). Este sofre uma ecdise ainda no ovo, dando origem ao J₂. O J₂ é móvel, vermiforme, infectivo e migra no solo à procura de raízes da planta hospedeira.

As plantas exercem atração sobre esses nematoides através de compostos orgânicos presentes em exsudados, secreções e mucilagens liberados pelas raízes, os quais são perceptíveis aos órgãos sensoriais dos fitonematóides, como anfídeos e fasmídeos (Dropkin, 1976; Perry e Aumann, 1998). Fatores de

natureza física e química, como gradiente de temperatura, potencial redox, pH, grau de umidade, concentração de gases [como o oxigênio (O₂) e o dióxido de carbono (CO₂)] e fatores de natureza biológica (como a colonização das raízes por microrganismos) afetam a atração de fitonematóides em direção ao sistema radicular (Bird, 1959; Oostendorp e Sikora, 1990; Gourd *et al.*, 1993).

Os J₂ movem-se através dos tecidos das plantas e estabelecem o seu sítio de alimentação no parênquima vascular, resultando em um complexo relacionamento com a planta (Taylor e Sasser, 1983). O J₂ torna-se sedentário e induz a formação de células especiais chamadas células gigantes. Após três ecdises, surgem os adultos, que podem ser fêmeas ou machos.

Espécies do gênero *Meloidogyne* caracterizam-se por acentuado dimorfismo sexual: a fêmea apresenta o corpo globoso, piriforme ou em forma de saco, sendo sedentárias, enquanto o macho tem corpo vermiforme e é móvel (Eisenback e Triantaphyllou, 1991). A penetração das raízes é realizada pelo J₂ na região de alongamento radicular ou meristemática. Em seguida, o J₂ migra até a zona de maturação dos tecidos, onde estabelece um sítio de alimentação próximo à região vascular, tornando-se sedentário (Gonçalves e Silvarolla, 2001). O nematoide começa então a se alimentar, secretando substâncias nas células, as quais vão alterá-las morfológica e fisiologicamente. O nematoide passa então por três ecdises até atingir a fase adulta, quando a fêmea adquire a forma globosa, depositando seus ovos geralmente no exterior da raiz. A ovoposição permanece unida por uma matriz gelatinosa secretada pela própria fêmea (Costa, 2000). De acordo com Starr (1993), uma única fêmea de *M. incognita* ovoposita em média 770 ovos/massa, sendo que cada fêmea pode ovopositar de 30-40 ovos por dia.

O desenvolvimento embriogênico e a posterior eclosão do J₂ dependem de condições naturais favoráveis, como temperatura, oxigênio e níveis de umidade no solo. Na ausência desses fatores fisiológicos, esses nematoides apresentam duas adaptações que interferem no seu desenvolvimento embriogênico: a diapausa, que é inibição do desenvolvimento embrionário não reversível (Guiran, 1979, Jones 1998, Wright e Perry, 2006) e a dormência, processo retornável após normalização das condições naturais (Ishibashi *et al.*, 1960). De acordo com Guiran e Villemin (1980), fitonematóides tropicais apresentam taxas de diapausa próximas a 10%. Em condições de campo, a dormência pode ocorrer

na ausência de plantas que produzem fatores que induzem a eclosão, fatores climáticos sazonais e substâncias produzidas por microrganismos do solo que podem estimular a eclosão de J₂ (Ellenby, 1963).

Ovos de *Meloidogyne* spp. são cilíndricos e compostos por três membranas biológicas: camada externa vitelínica, camada média quitinosa e interna lipídica. Mudanças na estrutura dessas membranas resultam na perda de permeabilidade do ovo. De acordo com Bird e Bird (1976), ovos de *M. javanica* são impermeáveis a tetróxido de ósmio, entretanto, após a embriogênese os J₂ tornam-se suscetíveis a componentes químicos. Meyer *et. al* (2006), relataram o efeito tóxico de extratos vegetais a ovos com J₂ de *M. incognita*. Outros componentes, como aminoácidos biogênicos serotonina e octopamina, reduziram o desenvolvimento embriogênico de *M. incognita* (Masler, 2008).

Segundo Bird (1968), enzimas secretadas pelas glândulas faringianas de J₂ de *M. javanica* causam hidrólise e flexibilidade na membrana dos ovos. Premachandran *et al.* (1988) sugerem que J₂ de *M. incognita* após a embriogênese produzem e secretam proteínas via sistema secretório-excretório. Subseqüentemente, Perry *et al.* (1992) demonstraram que o desenvolvimento embrionário está correlacionado com a atividade de lipases e proteinases, incluindo colagenase e quitinase. Estas enzimas apresentam atividade na membrana do ovo resultando em flexibilidade e permeabilidade da membrana no momento da eclosão. Wallace (1968) observou aumento na permeabilidade para água em ovos de *M. javanica* após a embriogênese. Ellenby (1974) relatou que a perda na permeabilidade do ovo junto à ação mecânica do estilete resulta na eclosão dos J₂.

A sobrevivência de fitonematóides em condições ambientais adversas pode variar entre as espécies e entre os seus estádios de desenvolvimento. Em condições normais, no ovo ocorrem multiplicações celulares, formação e organização dos tecidos, desenvolvimento embrionário passando pelos períodos de mórula, blástula e gástrula, formando o J₁, que após a primeira ecdise passa a J₂. No entanto, ainda dentro do ovo, vários fatores abióticos e bióticos podem influenciar na embriogênese e na eclosão de J₂ de *Meloidogyne* spp. (Bird, 1972; Lee e Atkinson, 1977; Wallace, 1971).

Ao investigar o efeito da temperatura na eclosão de J₂ de *Meloidogyne* spp., Campos *et al.* (2008) observaram maiores movimentações de J₂ dentro do

ovo e maiores índices de eclosão a 28°C. Da mesma forma, Freire e Ferraz (1977) também observaram maior eclosão de J₂ de *M. incognita* e de *M. javanica* a 28 °C. Ao verificar o efeito dessa mesma temperatura no desenvolvimento embrionário a partir de ovos no estágio de duas células incubados por seis dias, foi observado que quase oitenta e quatro por cento dos ovos apresentavam J₂ formados em seu interior.

Além de fatores abióticos, observações de interação entre ovos de fitonematóides e outros microrganismos indicaram que fatores bióticos também podem influenciar no desenvolvimento embriogênico desses fitonematóides. Ellenby (1963) sugeriu que substâncias produzidas por microrganismos do solo podem estimular a dormência espontânea em J₂ de *Heterodera rostochiensis* (Wollenweber), efeito que não foi observado quando os ovos foram incubados com água da torneira ou solução salina.

2.1.1 *Meloidogyne mayaguensis*

Este fitonematóide foi descrito em Porto Rico parasitando berinjela (Rammah e Hirschmann, 1988), e em 1989 foi detectado em Cuba em café (*Coffea arábica* L.) (Decker e Rodriguez, 1989). No Brasil, o primeiro relato foi feito em goiabeiras nos municípios de Petrolina, Curaçá e Maniçoba (Carneiro *et al.*, 2001). Possivelmente, este nematóide já havia sido relatado erroneamente como *M. incognita* raça 2 por Moura e Moura (1989). Atualmente, tem-se encontrado uma ampla incidência deste nematoide no Brasil na cultura da goiaba.

Segundo Carneiro (2003), *M. mayaguensis* está distribuído em países tropicais, como África do Sul, Senegal, Costa do Marfim e Burkina Fasso. Nas Américas, além do Brasil, *M. mayaguensis* está presente em Trinidad e Tobago, Porto Rico, Cuba, Martinica e EUA em diversos hospedeiros, como pimentão, berinjela, tomate, café, goiaba, melancia, brócolis, beterraba, anonáceas, soja, batata-doce, fumo, feijão, abóbora e batata, dentre outras (Brito *et al.*, 2003; Carneiro, 2003).

Em goiabeiras, o parasitismo por *M. mayaguensis* causa um declínio generalizado da planta. Os sintomas primários deste nematoide são galhas de pequenas a grandes dimensões no sistema radicular, com necroses associadas a uma diminuição drástica das raízes finas. O nematoide parasita todos os tipos de raízes, desde as radículas superficiais até a raiz pivotante mais lignificada,

localizada a mais de 50 cm de profundidade. Os sintomas secundários no campo são forte bronzeamento nos bordos das folhas, seguindo o amarelecimento total da parte aérea e culminando com desfolhamento generalizado e morte da planta. Quanto aos frutos, estes perdem a sua aparência superficial lisa e verde brilhante e amadurecem prematuramente, podendo ser de tamanho abaixo do padrão de comercialização (Moreira e Henriques, 2001). Em goiabeiras altamente infectadas por *M. mayaguensis*, pode ocorrer a mortalidade de todo o plantio após um ano (Moreira e Henriques, 2001).

De acordo com Carneiro *et al.* (2001), essa espécie apresenta alta virulência, com potencial de multiplicação em cultivares de tomateiro resistentes a *M. incognita* (Kofoid e White) portadoras do gene *Mi* e também a resistência em bata-doce e soja, todos resistentes a *M. incognita*, *M. javanica* (Treub) e *M. arenaria* (Neal).

Até o momento, não existe controle eficaz da meloidoginose da goiabeira. Em geral, pomares infestados têm a sua produtividade gradativamente comprometida, evoluindo para a morte em médio prazo. Como medidas de controle deve-se utilizar principalmente a prevenção, através do plantio de mudas de goiabeira comprovadamente sadias e de análises nematológicas do solo onde se pretende estabelecer o pomar, já que o controle pós-plantio é muito difícil, caro e trabalhoso (Moura *et al.*, 2003). As melhores chances de sucesso contra *M. mayaguensis* estão no melhoramento vegetal e no uso de porta-enxerto resistente (Campos *et al.*, 1990; Campos, 1997). Entretanto, até o presente não existem genótipos comerciais de goiabeiras resistentes a *M. mayaguensis*. Moreira e Henriques (2001), avaliando a resistência do araçá (*Psidium* sp.), indicaram essa como uma possível estratégia para se obter plantas resistentes ao fitonematóide através da enxertia. No entanto, a compatibilidade dessas plantas com goiabeiras foi de apenas 50%. Ao avaliar vinte e seis acessos de goiabeira e um de araçá quanto à resistência a *M. mayaguensis*, Burla *et al.* (2007) verificaram que o araçá apresentou resistência ao nematoide.

Um aspecto importante refere-se ao uso de nematicidas, que não impedem o desenvolvimento de *M. mayaguensis* (Moreira *et al.*, 2001). Sua baixa eficiência, somada à alta toxicidade e à ausência de produtos registrados para a goiabeira, ilustram as desvantagens dos produtos químicos, sendo necessário desenvolver outras estratégias de controle que possam ser utilizadas pelos produtores, com

menores danos ao meio ambiente e proporcionando uma agricultura em bases sustentáveis.

De acordo com Gomes (2007), a utilização de resíduos orgânicos em plantas infectadas na região de São João da Barra, RJ, resultou na redução do número de J2 e do número de galhas, contribuindo para retardar o declínio de pomares infestados por *M. mayaguensis* e aumentando-lhes a produtividade e minimizando os prejuízos sofridos pelos produtores.

2.2 Nematoides Entomopatogênicos

Esses nematoides são assim conhecidos por causarem doença e morte em diferentes espécies de artrópodes, com grande rapidez (24 a 72 horas). A patogenicidade desses nematoides é conferida pela sua associação com bactérias simbiotes, as quais são patogênicas aos insetos (Poinar, 1990). NEPs pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), na qual estão localizadas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994, enquanto a família Heterorhabditidae possui o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976. Atualmente são aceitas 14 espécies do gênero *Heterorhabditis* (Adams *et al.*, 2002).

NEPs têm sido utilizados em larga escala pelo homem na agricultura como agentes de controle biológico, pois eles são considerados efetivos no controle de uma variedade de pragas de solo como biopesticidas, com diversas vantagens sobre inseticidas químicos (Klein, 1990), (Kaya e Gaugler, 1993). De acordo com Capinera e Epsky (1992), uma das vantagens dos NEPs é a biossegurança quanto à sua aplicação, pois não causam toxicidade a humanos ou plantas. Possuem também um amplo número de espécies adaptadas a diversos ambientes, potencializando-os para o controle de pragas. Outra vantagem é sua capacidade de se locomover no solo à procura de hospedeiros, para os quais são atraídos por diferencial no teor de CO₂ (Gaugler *et al.*, 1980) e possivelmente por componentes fecais (Schmidt e All, 1979). Estes nematoides se reproduzem no inseto hospedeiro e, desta forma, a gama de hospedeiros efetivos de uma dada espécie ou linhagem é limitada, não permitindo que o nematoides cause mortalidade indiscriminada (Hazir *et al.*, 2003).

Heterorhabditis sp. possui simbiose com bactérias do gênero *Photorhabdus* spp. Han e Ehlers, 2001. No gênero *Photorhabdus* spp., três espécies estão associadas com *Heterorhabditis* spp., sendo que *P. luminescens* é dividida em cinco subespécies: *P. luminescens luminescens* (Thomas e Poinar 1979), *P. l. laumondii* (Fischer, 1999), *P. l. akhurstii* (Fischer, 1999), *P. l. kayaii* (Hazir, 2004) e *P. l. thraciaensis* (Hazir, 2004) (Hazir *et al.*, 2004).

2.2.1 O Gênero *Heterorhabditis*

Segundo Poinar (1990), adultos do gênero *Heterorhabditis* sp. são encontrados na natureza tanto na forma hermafrodita quanto na forma anfimítica, apenas no interior de cadáveres de insetos infectados. A primeira geração é composta por formas hermafroditas, seguindo-se uma ou mais gerações anfimíticas. As fêmeas hermafroditas se caracterizam por estilete ausente, extremidade truncada ou levemente arredondada, seis lábios e porção anterior do esôfago envolvendo a base da cavidade bucal. As fêmeas são anfidélficas, com vulva equatorial e ovários que se estendem além da abertura vulvar. São ovíparas, tornando-se ovovivíparas quando mais velhas. As fêmeas hermafroditas têm esperma na região proximal da gônada e vulva funcional. As formas anfimíticas têm esperma na parte proximal do oviducto e vulva não-funcional para a passagem de ovos (apenas para o acasalamento) e cauda com término pontiagudo. Os machos surgem apenas na geração anfimítica, tendo testículo único, espículo pareados e separados, quase retilíneos. Os J₃ são também denominados juvenis infectantes (JIs) e normalmente estão contidos no interior da cutícula do estágio anterior. Apresentam boca e ânus fechados, estoma com dente dorsal e, em alguns casos, modificações também nas superfícies subventrais (pequenos espinhos, ganchos ou engrossamentos) e cauda pontiaguda. As bactérias são encontradas ao longo da luz intestinal, desenvolvendo-se sempre em fêmeas hermafroditas.

O ciclo de vida desses nematoides inclui três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulto (fêmeas e machos). A fase juvenil é composta por quatro estádios (J₁, J₂, J₃ [ou JI] e J₄). O JI é o estágio do nematoides encontrado no solo, que carrega as bactérias simbiontes. Esses buscam o hospedeiro e os localizam pelos produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura. A infecção é iniciada com a penetração dos JIs pelas aberturas naturais do inseto

(boca, ânus ou espiráculos) ou através da cutícula por meio de um dente quitinoso localizado em sua extremidade anterior. Dentro do inseto, os NEPs migram para a hemolinfa e liberam suas células bacterianas. Estas bactérias produzem toxinas e matam o hospedeiro por septicemia em 24 a 48 horas (Poinar, 1990). A seguir, os NEPs começam a multiplicar-se e posteriormente os JIs alimentam-se das bactérias e dos tecidos por elas decompostos, passando então para o estágio J₄. Deste estágio irão se formar as fêmeas hermafroditas; essas fêmeas colocam ovos que darão origem à segunda geração, composta por machos e fêmeas anfimíticas. Os nematoides podem apresentar duas ou três gerações dentro do hospedeiro, dependendo da disponibilidade de alimento no cadáver. Quando o alimento é exaurido, o J₃ retém células da bactéria em seu interior e abandona o cadáver como JIs. Os JIs permanecem no solo à procura de um novo inseto hospedeiro até por meses, dependendo da temperatura, da umidade do solo e da espécie de nematoide envolvida.

2.2.2 *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Esse isolado apresenta estratégia “cruiser” de busca ao hospedeiro (Lewis, 2002), e é originário da floresta tropical de Monte Negro, RO, Brasil (Dolinski *et al.*, 2008). Nos últimos anos várias linhas e projetos de pesquisa têm sido conduzidos abordando diferentes aspectos deste organismo, o que permitirá um maior conhecimento deste agente em um futuro próximo (Alves, 2006; Del Valle *et al.*, 2005 a,b; Dolinski *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Del Valle *et al.* (2005) e Dolinski *et al.* (2006) demonstraram elevada susceptibilidade do quarto ínstar larval do gorgulho-da goiaba (*Conotrachelus psidii*) Marshall, a *H. baujardi* LPP7, em experimentos conduzidos em laboratório e casa-de-vegetação.

De acordo com Shapiro-Ilan *et al.* (2006), para que um agente biológico seja eficiente no controle de pragas agrícolas de solo, estes devem permanecer infectantes no solo por um período de tempo mínimo de duas semanas. Del Valle *et al.* (2007), observaram que JIs de *H. baujardi* LPP7 permaneceram infectantes durante 4 meses de experimento a campo. Segundo Del Valle *et al.* (2008 a,b), em estudos realizados com JIs emergidos de insetos-cadáveres, estes nematoides apresentaram maior capacidade migratória, infectividade e

persistência no solo em comparação a outros isolados de NEPs aplicados em suspensão aquosa (Shapiro e Glazer, 1996; Shapiro e Lewis, 1999).

Nos últimos anos têm sido conduzidas diversas pesquisas avaliando *H. baujardi* LPP7 como agente de controle biológico em diferentes hospedeiros. Machado *et al.* (2009 a,b), pesquisando os efeitos da ação patogênica de *H. baujardi* LPP7 na biologia reprodutiva, longevidade e mortalidade de estirpes sensíveis e resistentes a carrapaticidas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), verificaram que esses NEPs podem diminuir os impactos ambientais, econômicos e sociais causados pelo uso indiscriminado de carrapaticidas. Minas (2008), avaliando o potencial de vários isolados de NEPs contra pupas e larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) identificou *H. baujardi* LPP7 como um dos isolados mais promissores, por ser mais resistente às condições tropicais.

Alguns estudos indicaram a capacidade supressiva desse isolado e/ou suas bactérias simbiotas quando em contato com fitonematóides (Ferreira, 2007; Molina, 2008). De acordo com Ferreira *et al.* (2009 b), a utilização de diferentes soluções para esterilização externa desse isolado possibilita o desenvolvimento de novas pesquisas que possibilitem identificar melhor a relação desses NEPs com suas bactérias simbióticas e outros microrganismos sempre que se fizer necessária a sua utilização em condições assépticas.

2.3 *Photorhabdus luminescens*

P. luminescens é uma bactéria anaeróbica facultativa (Boemare *et al.*, 1993), gram-negativa, com suas células medindo de 4.5 a 5.1 μ (Nagesh *et al.*, 2001). Suas linhagens apresentam duas formas: primária e secundária (Akhurst e Boemare, 1990). Tem sido sugerido que a forma primária está mais adaptada às condições do interior do nematoide e do inseto, enquanto a forma secundária pode ser adaptada como organismo de vida livre no solo (Smigielski *et al.*, 1994). Dessa forma, a forma primária é capaz de manter uma simbiose estável com o nematoide, enquanto a forma secundária ocorre em culturas *in vitro* prolongadas e em cadáveres de insetos (Boemare *et al.*, 1997; Forst *et al.*, 1997; Akhurst e Boemare, 1990). A Fase I ou fase primária da bactéria expressa uma variedade de fenótipos que podem ter papel na estabilização da infecção. Estes fenótipos estão ausentes ou apresentam-se em quantidades reduzidas nas células na Fase

II, ou fase secundária (Forst *et al.* 1997). Durante a fase primária a bactéria produz antibiótico capaz de inibir o crescimento de outras bactérias (Akhurst, 1980). Hu *et al.* (1998) estudaram a composição metabólica da interação de *Photorhabdus* – *Heterorhabditis* sp. – *Galleria mellonella* L. e encontraram o antibiótico 3,5-dihidroxi-4-etilbenzeno e diversos derivados da antraquinona. Além da produção de antibióticos, a bactéria durante a fase I produz enzimas capazes de degradar os tecidos do hospedeiro, pigmentos, proteases extracelulares e apresentam mais bioluminescência que as células secundárias (Akhurst, 1982; Rosner *et al.*, 1996).

A bioluminescência ocorre em todo gênero *Photorhabdus* sp. em placas com ágar e meio líquido. Em condições *in vivo* a bioluminescência é vista apenas após a morte do inseto, quando a degradação do tecido está em fase avançada (Daborn, 2001). A função desse fenômeno ainda não é totalmente conhecida, no entanto, varias hipóteses indicam que esse fenômeno representa um sinal de sincronização entre as bactérias ou entre estas e os NEPs visando alertar ou confundir insetos noturnos, ou ainda atrair mais insetos próximos ao cadáver infectado (Hoffmann e Hoffmann, 1990).

As bactérias são carregadas no trato intestinal dos nematoides no estágio juvenil infectante (JI). Estes se fixam nas larvas do inseto susceptível, penetram na hemocele e liberam células primárias de *P. luminescens* na hemolinfa do inseto (Boemare e Akhurst, 1988; (Rosner *et al.*, 1996). A bactéria prolifera, mata o inseto hospedeiro e fornece condições ideais para a reprodução dos nematoides (Rosner *et al.*, 1996), que crescem preferencialmente na presença de células primárias de *P. luminescens* (Rosner *et al.*, 1996). Quando as fontes de alimentação diminuem no cadáver do inseto a bactéria dá origem à sua forma secundária (Forst e Clark, 2002).

Não é comum o isolamento de *Photorhabdus* sp. e *Xenorhabdus* sp. no solo, e tem sido observado que em geral estas bactérias não podem existir no solo na ausência de nematoides associados a estas (Burnell e Stock, 2000). Foi encontrado através de marcadores genéticos de cepas de *X. nematophila* (Poinar and Thomas 1965) e *P. luminescens* em solo não estéril e foi observado que a liberação de células declinou para abaixo do limite de detecção em 7 dias. Embora unidades de colônias viáveis não tenham sido detectadas após 7 dias, a média dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) sugeriu que as células poderiam

ter entrado em dormência, fase não cultivável, porém viável (Burnell e Stock, 2000).

Recentemente uma bactéria patogênica a vertebrados com características parentais com *P. luminescens* foi encontrada na Austrália sendo descrita como *P. asymbiotica* (Fischer-Le *et al.*, 1999). Segundo Waterfield *et al.* (2009), estudos moleculares sugerem evolução de *P. asymbiotica* para aumentar a gama de hospedeiros.

2.4 Associação simbiote entre bactéria e NEPs

Photorhabdus e *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) são bactérias simbiotes dos NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema*, respectivamente (Han e Ehlers, 2001). Esta associação bactéria- nematoide é considerada simbiote mutualística, pois o nematoide é dependente da bactéria para: (1) matar rapidamente o seu inseto hospedeiro; (2) criar um ambiente favorável para o seu desenvolvimento através da produção de antibióticos que suprimem a competição por outros microrganismos necrófitos e (3) transformar o tecido do hospedeiro em fonte de alimentação. Por sua vez, a bactéria necessita do nematoide para: (1) proteger-se do ambiente externo; (2) penetrar na hemocele do hospedeiro e (3) para inibir proteínas antibacterianas do hospedeiro (Hazir, 2003). Segundo Forst e Clarke (2002), a simbiose entre bactéria e nematoide pode ser descrita como uma associação cíclica que se inicia e se finaliza com o JI no solo. Forst e Clarke dividiram o ciclo em três estágios baseados no desenvolvimento temporal da bactéria e do nematoide.

Estágio I: neste estágio, JIs de *Heterorhabditis* sp. possuem uma espécie de dente quitinoso que pode ser usado para penetrar na cutícula do inseto, permitindo que o nematoide entre diretamente na hemocele (Burnell e Stock, 2000).

Estágio II (inicial): está associado com a recuperação ou reinício do desenvolvimento do JI, a liberação da bactéria na hemolinfa e com a morte do inseto. As bactérias se multiplicam e protegem o inseto contra infecções por outros microrganismos através de mecanismos celulares mediados por haemócitos (Götz, *et al.*, 1986) e químicos de defesa.

Estágio II (tardio): esse estágio é caracterizado pelo crescimento bacteriano a altas densidades no inseto. Além disso, a bioconservação do cadáver do inseto

é vista como uma fonte de nutrientes para reprodução e desenvolvimento dos nematoídeos. A habilidade de reprodução do nematoídeo é dependente da presença da bactéria no cadáver do inseto. No caso da associação *Photorhabdus* sp. - *Heterorhabditis* sp., esta dependência parece ser obrigatória e específica. Dependendo da espécie e das condições ambientais, a nova geração de J1 emerge do inseto entre 7 e 21 dias após a entrada inicial no hospedeiro. Durante este tempo é essencial que o cadáver do inseto esteja protegido da contaminação por organismos saprófitas.

Estágio III: é caracterizado pela formação de JIs e pela colonização dos juvenis pelas bactérias.

Formação dos juvenis infectantes: Os JIs dos NEPs compartilham diversas características, com o “larva dauer” dos nematoídeos de vida livre. Na presença de alimento, os nematoídeos se desenvolvem dos estágios juvenis normais (J1, J2, J3 e J4) para forma adulta. Quando o alimento é escasso e a densidade dos nematoídeos é alta, os JIs se desenvolvem em um estágio J3 alternativo denominado “larva dauer”.

Colonização do juvenil pela bactéria: A colonização requer interação específica entre o intestino do nematoídeo e a superfície celular da bactéria (Gaugler R., 2002).

2.5 Interação entre *Photorhabdus* sp. e outros microrganismos

Photorhabdus sp. liberam fatores antimicrobianos de largo espectro mostrando forte ação antibacteriana e antifúngica (Li *et al.*, 1995 e Richardson *et al.*, 1988). Além de antibióticos uma série de moléculas protéicas também é liberada e pode ser capaz de degradar macromoléculas em células-alvo e mostrou-se ativa contra protozoários e outros isolados de *Photorhabdus* sp. (Sharma *et al.*, 2002).

Estudos de interação entre isolados de *Photorhabdus* e protozoários de vida livre no solo *Acanthamoeba polyphaga* (Puschikarew, 1913), demonstraram que essas amebas não foram capazes de crescer e reproduzir na presença de *P. luminescens* isolado TT01. No entanto, as amebas não são diretamente mortas pela bactéria, elas nadam em direção aos protozoários, fixam-se, formam microcolônias, não penetram e não realizam fagocitose, sugerindo que

Photorhabdus sp. impedem a absorção nesses protozoários de forma semelhante aos insetos (Brugirard *et al.*, 2005).

Ao investigar o nível de especialização da associação simbiótica entre *Steinernema carpocapsae* (Filipjev), suas bactérias simbióticas (*Xenorhabdus nematophila*, Poinar e Thomas 1965), e bactérias simbióticas de outros gêneros de NEPs, Sicard *et al.* (2004), observaram que isolados de bactérias que vivem em simbiose com outros gêneros de NEPs eram patogênicas a *S. carpocapsae* e sugeriram que a coevolução entre NEPs e bactérias conduziu a um elevado nível de especialização mutualística, o que justifica a incapacidade de nematoides não específicos resistirem a fatores de virulência produzidos por estas bactérias.

Até o presente momento poucos estudos com interação de *Photorhabdus* sp. e nematoides foram desenvolvidos. Sicard *et al.* (2004), demonstraram comportamento de evasão de *Caenorhabditis elegans* quando expostos a isolados de *P. luminescens*. Sicard *et al.* (2007) ao verificar a interação entre três isolados de *P. luminescens* pertencentes a três subespécies isoladas em diferentes NEPs e diferentes países sobre isolados de *C. elegans* do Norte da Alemanha (MY15 e MY18). Haber *et al.* (2005) verificaram que dois isolados reduziram a sobrevivência e a reprodução dos nematoides. Da mesma forma, um único isolado *P. luminescens luminescens* Hb apresentou efeito patogênico sobre a *C. elegans* (Couillault e Ewbank, 2002).

O mecanismo pelo qual os nematoides fazem distinção entre as bactérias ainda não está claro (Waterfield, 2005). Alguns metabólitos secundários produzidos por *P. luminescens* isolado HD, quando aplicados a *C. elegans* e NEPs do gênero *Steinernema* apresentaram grande efeito nematicida. No entanto, não houve efeito sobre NEPs do gênero *Heterorhabditis* sp. (Hu e Webster, 1999). De acordo com Waterfield *et al.* (2009), os genes responsáveis pela relação mutualística entre *Photorhabdus* sp. e NEPs parecem ser específicos. O gene CIP codifica uma proteína de inclusão cristalina que propicia o desenvolvimento somente de NEPs do gênero *Heterorhabditis* na presença de *P. luminescens* (Bintrim Liahona, 1998). No entanto, nada se sabe sobre a distribuição de tais genes entre o gênero *Photorhabdus*. Curiosamente, essa relação mutualística não parece se estender para outros gêneros de nematoides, pois esta bactéria foi patogênica quando aplicada a *S. carpocapsae* (Sicard *et al.*, 2004) e *M. incognita* (Hu e Webster, 1995).

2.6 Interação entre NEPs e nematoides fitoparasitas.

O antagonismo entre NEPs e fitonematóides foi primeiramente documentado em 1986, quando a aplicação de *S. glaseri* suprimiu populações de *M. javanica* em plantas de tomate mantidas em casa de vegetação (Bird and Bird, 1986). Gouge *et al.* (1994), Grewal *et al.* (1999), Ishibashi e Choi (1991), Ishibashi e Kondo (1986) e Perry *et al.* (1998), utilizando diferentes concentrações de NEPs, também verificaram uma significativa supressão de fitonematóides. Jagdale (2002), em estudos com aplicação de JIs de *S. carpocapsae* sobre fitonematóides em “boxwood” (*Buxus* spp.), verificou uma redução na incidência de nemat^óides de vida livre no solo.

Algumas hipóteses foram propostas para explicar a relação entre NEPs e nematoides fitoparasitas. Bird e Bird (1986) sugeriram que NEPs são atraídos para as raízes das plantas hospedeiras pelo CO₂ acumulado ao longo das raízes, competindo assim por espaço com os fitonematoides. Grewal *et al.* (1999) e Hu *et al.* (1999) indicaram que aleloquímicos produzidos por NEPs e suas bactérias simbiotes repelem e intoxicam fitonematoides, declinando suas reações.

Bird e Bird (1986) e Jagdale *et al.* (2002) observaram atração de *S. glaseri* por raízes de tomateiro e sugeriram que a supressão de fitonematoides por NEPs deveria estar ligada à competição entre os dois grupos de nematoides. Ishibashi e Kondo (1986) e Jagdale *et al.* (2002) também atribuíram o efeito de supressão pelos NEPs ao aumento da densidade de predadores resultantes da aplicação da biomassa de nematoide no solo.

Nos últimos anos várias pesquisas com objetivo de entender a relação entre NEPs e fitonematóides foram desenvolvidas. Somasekhar *et al.* (2002), ao avaliar a interação entre NEPs e nematóides fitoparasitas e de vida livre, verificaram um efeito seletivo e supressivo dos isolados de *H. bacteriophora* Poinar, 1979 GPS11 e HP88 e *H. indica* Poinar, Karunakar e David, 1992, In2 sobre fitonematóides, reduzindo-lhes significativamente a abundância, a diversidade e o desenvolvimento. Lewis *et al.* (2001), ao avaliar a aplicação inundativa do nematóide *S. feltiae* Filipjev, 1934 e sua bactéria simbiote *X. bovienii* sobre *M. incognita* em raízes de tomateiro, verificaram que houve uma redução no número de galhas, não sendo evidenciado efeito algum sobre a penetração dos J₂ nas raízes. No entanto, Perez e Lewis (2004) demonstraram que a aplicação de *S.*

feltiae diminuiu a penetração de *M. hapla* (Chitwood) em plantas de tomate e amendoim.

De acordo com Lewis e Grewal (2005), ainda há controvérsia sobre o uso de NEPs e suas bactérias simbiotes no controle de fitonematóides. Alguns trabalhos discutem a eficiência do uso de NEPs e os resultados indicam que ocorre uma variação de acordo com a espécie de nematoide utilizada, métodos de aplicação, dosagens, solo, cultivo, nível populacional do fitoparasita, sistemas e momentos de aplicação. Em grande parte das pesquisas foi observada uma diminuição nas populações de nematoides fitoparasitas quando em contato com NEPs, mas as causas desse efeito ainda não são conhecidas.

De acordo com Shapiro-Ilan *et al.* (2006), avaliando os efeitos supressivos de *S. feltiae*, *S. riobrave* (Cabanillas, Poinar e Raulston) e suas bactérias simbiotes *X. bovienii* (Akhurst), aplicados em suspensão ou na forma de cadáver sobre *M. partityla* (Kleynhans) em plantas de nozes (*Carya illinoensis*), observaram uma redução do número de massas de ovos por planta.

No Brasil, Ferreira (2007) avaliou a liberação de *P. luminescens* na presença de diferentes concentrações de ovos de *M. mayaguensis* em areia e verificou que houve liberação da bactéria *P. luminescens* frente a diferentes concentrações de ovos, indicando que a presença do nematoide fitoparasita induziu a liberação das bactérias por JIs.

Molina *at al.* (2007), avaliando o efeito do complexo NEPs / bactérias sobre ovos e J₂ de *M. mayaguensis* em diferentes fases de infecções e diferentes estágios, verificaram uma redução do número de galhas, sugerindo que *H. baujardi* LPP7, *S. feltiae* e suas bactérias simbiotes poderiam estar inibindo a eclosão dos ovos ou reduzindo a capacidade de infecção dos J₂.

Molina (2008) verificou redução do número de galhas radiculares induzidas por *M. mayaguensis* em raízes de tomateiro co-inoculadas com NEPs (vivos ou mortos), *Photorabdus* sp. ou *Xenorabdus* sp. O autor sugere um possível efeito dos JIs na redução da infecção por ovos e/ou alguma interferência no J₂, que poderia afetar o processo de multiplicação e, muito possivelmente, o efeito do complexo NEP-bactéria poderia estar causando algum tipo de interferência na penetração ou um determinado antagonismo sobre J₂, impedindo assim a infecção do fitoparasita. Na avaliação da interação entre NEPs e *M. mayaguensis* em areia, houve repulsão dos J₂ de *M. mayaguensis* na presença de *S. feltiae* e *H*

baujardi, sugerindo que, a curtas distâncias, os NEPs podem estar causando uma interferência na capacidade de busca do J₂.

3 OBJETIVO DO TRABALHO

- Estudar a interação entre o fitonematóide *M. mayaguensis* e o nematoide entomopatogênico *H. baujardi* LPP7.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de J1s de *H. baujardi* LPP7 na eclosão de J2 de *M. mayaguensis*;
- Avaliar a influência de J1s de *H. baujardi* LPP7 na embriogênese de *M. mayaguensis*;
- Avaliar a infecção de raízes de tomateiro por J₂ de *M. mayaguensis* na presença de *H. baujardi* LPP7;
- Avaliar a influência de *H. baujardi* LPP7 na prolificidade de *M. mayaguensis*.

4 TRABALHOS

4.1 INFLUÊNCIA DO NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen e Moens, 2003 LPP7 (NEMATODA: RHABDITIDA) NA EMBRIOGÊNESE E ECLOSÃO DOS JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO DO NEMATOIDE FITOPARASITA *Meloidogyne mayaguensis* Rammah e Hirschmann, 1988 (TYLENCHIDA: MELOIDOGINIDAE).

RESUMO

Nos últimos anos alguns trabalhos têm investigado o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) e suas bactérias simbiontes como uma possível estratégia para o controle de fitonematóides. No entanto, são necessários estudos que comprovem como ocorre essa interação e em que fase(s) do desenvolvimento do fitoparasita ocorre o efeito dos NEPs. Para verificar a influência de *H. baujardi* LPP7 na embriogênese de *M. mayaguensis* foram comparados dois tratamentos: a embriogênese em água destilada e em presença de J1s de *H. baujardi* LPP7. A embriogênese foi avaliada a partir do estágio de duas células. Cada tratamento consistiu de 25 repetições (ovos de *M. mayaguensis*), os quais foram distribuídos em cinco blocos compostos por lâminas de vidro escavadas. O efeito de *H. baujardi* foi avaliado pela adição de 10 J1s/lâmina. Avaliou-se o tempo transcorrido entre o estágio de duas células até formação de J₂. Para verificar a influência de *H. baujardi* na eclosão de J₂ de *M.*

mayaguensis, foram comparados dois tratamentos: eclosão de J₂ em água destilada e eclosão de J₂ em presença de JIs vivos de *H. baujardi* LPP7. Cada tratamento consistiu de 25 repetições (ovos com J2 já formados em seu interior e móveis), os quais foram distribuídos em cinco blocos, representados por lâminas de vidro com uma cavidade central de volume de 1 mL. O efeito dos JIs de *H. baujardi* LPP7 foi avaliado pela adição de 10 JIs/lâminas. A cada 24 horas, alíquotas da água contidas nas lâminas foram extraídas e plaqueadas sob condições estéreis para se avaliar a concentração de UFC's de *Photohabdus* sp. Avaliou-se a eclosão acumulada de J₂ em função do tempo dos dois tratamentos. Em ambos os ensaios as lâminas foram mantidas em BOD a 25°C pelo período necessário à formação do J₂ e à eclosão dos J₂, respectivamente. Os resultados demonstraram que os NEPs e/ou suas bactérias simbióticas não afetaram o desenvolvimento embriogênico de *M. mayaguensis*. Quanto à eclosão de J2 de *M. mayaguensis* em função do tempo na presença de *H. baujardi* LPP7, verificou-se atraso na eclosão no período de 24-72 horas (P<0,05). Conclui-se que JIs de *H. baujardi* LPP7, as bactérias ou seus metabólitos não têm efeito sobre a embriogênese de *M. mayaguensis*, possivelmente pela baixa permeabilidade dos ovos. O mesmo não aconteceu em ovos com J2, onde ocorreu retardo na eclosão que possivelmente está relacionada à liberação de bactérias simbióticas do gênero *Photorhabdus* sp. por *H. baujardi* LPP7.

ABSTRACT

In recent years some studies have investigated the use of entomopathogenic nematodes (EPNs) and their symbiotic bacteria as a possible strategy for the control of plant parasitic nematodes. However, they necessary study to prove how this interaction occurs and where phase (s) the development of the nematode is the negative effect of EPNs. To check the influence of *H. baujard* LPP7 in embryogenesis of *M. mayaguensis* were compared in two treatments: embryogenesis in distilled water and in the presence of IJs of *H. baujard* LPP7. In two separate embryogenesis was evaluated the stage of two cells. Each treatment consisted of 25 repetitions (eggs of *M. mayaguensis*), which were divided into five blocks composed of layers of glass excavated. The effect of *H. baujard* LPP7 was assessed by adding 10 JIs/slide. We evaluated the time elapsed between the two

cell stage until the formation of juvenile second stages (J₂). To verify the influence of *H. baujardi* LPP7 the outbreak of J₂ of *M. mayaguensis* were compared two treatments: J₂ hatching in distilled water and hatching J₂ in the presence of live *H. baujardi* LPP7 JIs. Each treatment consisted of 25 repetitions (J₂ eggs already formed inside and mobile), which were distributed in five blocks, represented by glass slides with a central cavity volume of 1 mL. Effect of the *H. baujardi* LPP7 JIs was assessed by adding 10 JIs/slides. Every 24 hours, aliquots of the water contained in the slides were taken and plated under sterile conditions to assess the concentration of UFC's of *Photobabdus* sp. We evaluated the cumulative hatching J₂ according to the time of the two treatments. In both tests the slides were kept in BOD at 25°C for the period necessary to the formation of J₂ and hatching of J₂, respectively. The results showed that NEPs and/or their symbiotic bacteria did not affect the embryogenic development of *M. mayaguensis*. The emergence of J₂ of *M. mayaguensis* in function of time in the presence of *H. baujardi* LPP7, was delay in the onset period of 24-72 hours (P <0.05). Conclude that JIs *H. baujardi* LPP7, bacteria or their metabolites have no effect on the embryogenesis of *M. mayaguensis*, possibly due to low permeability of the eggs. Not so in eggs with J₂, where there was delay in the outbreak that is possibly related to the release of symbiotic bacteria of the genus *Photobabdus* sp. by *H. baujardi* LPP7.

4.1.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos alguns trabalhos têm explorado o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) e/ou suas bactérias simbiotes como uma possível estratégia para controle de fitonematóides (Lewis *et al.*, 2001; Jaddale *et al.*, 2002; Somasekhar *et al.*, 2002; Lewis e Gaugler, 2005). Estudos recentes indicam redução do número de massas de ovos em mudas de noqueira inoculadas com *M. partityla* (Kleynhans) e co-inoculadas com *S. riobrave* (Shapiro-Ilan *et al.*, 2006). Molina *et al.*, (2007) observaram redução no número de galhas em plantas de tomate inoculadas com *M. mayaguensis* e co-inoculadas com *H. baujardi* LPP7. No entanto, são necessários mais estudos que comprovem como ocorre essa interação e em que fase(s) do desenvolvimento do fitoparasita ocorre o

efeito negativo dos NEPs, pois não se sabe ao certo se os NEPs afetariam a embriogênese e/ou a eclosão de J₂ de nematoides fitoparasitas.

Sabe-se que ovos de *Meloidogyne* spp. podem passar a um estado de completa inatividade chamado dormência (Ishibashi *et al.*, 1960). Durante esse período o metabolismo se mantém muito baixo, permitindo-lhes que sobrevivam por longo tempo em condições adversas, tais como falta de água, oxigênio ou temperaturas baixas (Curtis *et al.*, 2009). Em condições normais, no ovo ocorrem multiplicações celulares, formação e organização dos tecidos e desenvolvimento embrionário passando pelos períodos de mórula, blástula e gástrula, formando um juvenil de primeiro estágio (J₁), que após a primeira ecdise passa a J₂. Segundo Bird (1986), enzimas secretadas pelas glândulas faríngeas de J₂ causam hidrólise e flexibilidade na membrana dos ovos. Da mesma forma, Wallace (1968) observou aumento na permeabilidade à água em ovos de *M. javanica* após a embriogênese, e relatou que esse fator, junto à ação mecânica do estilete, resulta na eclosão dos J₂ (Ellenby, 1974).

Esse trabalho teve o objetivo de examinar a influência de JIs de *H. baujardi* LPP7 na embriogênese e na eclosão de J₂ de *M. mayaguensis*.

4.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Preparo e obtenção dos materiais biológicos

A criação de larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) utilizada para a multiplicação de *H. baujardi*, foi feita de acordo com a metodologia de Woodring e Kaya (1988). Os insetos adultos (mariposas) foram colocados em vidros com papel na tampa para que estes efetuassem a oviposição. O papel contendo os ovos foi cortado e colocado em potes plásticos com dieta artificial baseada em mel, leite e farinhas (Guerra, 1996). Após cerca de quinze dias a 28 °C em câmara de germinação, as larvas no 7º instar foram utilizadas para infecção por JIs.

A multiplicação de JIs de *H. baujardi* LPP7 foi feita utilizando-se 10 placas de Petri plásticas (6 cm de diâmetro) com o fundo revestido por papel de filtro (Whatman® N° 1), onde foram depositados 100 JIs de *H. baujardi* LPP7 em 0,5 mL de água. Sobre o papel filtro foram depositadas duas larvas de *G. mellonella* por placa. Após 120 horas, as larvas infectadas foram depositadas em armadilhas

de White modificadas para emergência e obtenção dos JIs. Os JIs foram coletados e armazenados em garrafa de cultura e mantidos a 25°C em câmara de germinação.

A contagem dos NEPs foi feita pelo método volumétrico, onde foram utilizadas 5 alíquotas de 10 µl da suspensão contendo os NEPs armazenados. As alíquotas foram colocadas em lâmina de Peters e a contagem foi feita em microscópio.

M. mayaguensis foi multiplicado em vasos de 30 cm de diâmetro, com uma mistura 1:1 de solo e areia autoclavados. Na base dos vasos foram depositadas raízes picadas de goiaba com galhas e posteriormente em cada vaso foram plantadas quatro mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.). Após aproximadamente 45 dias de inoculação, as raízes de tomateiro com galhas foram retiradas e cortadas. As raízes infectadas pelo nematoide foram colocadas em recipiente de vidro com 200 mL de água, e agitadas e vertidas em peneiras de 100 e 500 mesh para eliminação do material vegetal. Ovos e J₂ foram recolhidos na segunda peneira e utilizados.

Ovos e J₂ foram, alternativamente, obtidos por dissecação de massas de ovos sob microscópio estereoscópico (lupa) e selecionados para os experimentos.

Influência de JIs de *H. baujardi* LPP7 na embriogênese de *M. mayaguensis*.

Foram comparados dois tratamentos: a embriogênese de ovos em água destilada e com a presença de JIs de *H. baujardi* LPP7. Em dois ensaios distintos, a embriogênese foi avaliada a partir do estágio de duas células.

Cada tratamento consistiu de 25 repetições (ovos de *M. mayaguensis*), os quais foram distribuídos em cinco blocos inteiramente casualizados compostos por lâminas de vidro (Figura 1). O efeito de *H. baujardi* LPP7 foi avaliado pela adição de 10 JIs/lâmina, os quais foram substituídos a cada 48 horas. As lâminas foram mantidas em BOD a 25°C pelo período necessário à eclosão dos J₂, completando-se o volume de água quando necessário.

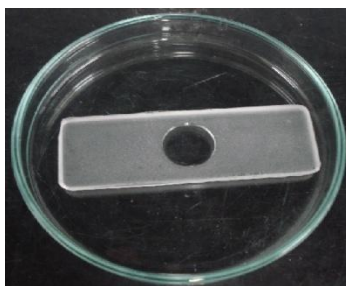


Figura 1. Lâmina de vidro com cavidade central.

Avaliou-se a evolução da embriogênese (estágio de duas células a J₂) ao longo do tempo dos dois tratamentos e a relação de ovos vivos e mortos dentre os tratamentos. Ao final da avaliação do ensaio, todos os ovos foram submetidos à solução de floxina B a 5% durante 30 minutos para identificação de ovos vivos e mortos.

O ensaio foi repetido uma vez nas mesmas condições e os dados submetidos à análise de variância, (teste F, P<0,05).

Influência de *H. baujardi* LPP7 na eclosão de J₂ de *M. mayaguensis*.

Foram comparados dois tratamentos: eclosão de J₂ em água destilada e eclosão de J₂ em presença de JIs vivos de *H. baujardi* LPP7. Cada tratamento consistiu de 25 repetições (ovos com J₂ já formados em seu interior e móveis), os quais foram distribuídos em cinco blocos, representados por lâminas de vidro com uma cavidade central de volume de 1 mL. O efeito dos JIs de *H. baujardi* LPP7 foi avaliado pela adição de 10 JIs/lâmina.

As lâminas foram mantidas em BOD a 25 °C pelo período necessário à eclosão dos J₂, completando-se o volume de água quando necessário. A cada 24 horas, alíquotas da água contida nas lâminas foram coletadas e plaqueadas em meio NA sob condições estéreis para se avaliar a concentração de unidades formadoras de colônias (UFC's) de *Photorhabdus* sp. As UFCs foram identificadas por teste de bioluminescência em luz negra.

Avaliou-se a eclosão (acumulada em função do tempo e total) dos dois tratamentos. O ensaio foi repetido sob as mesmas condições e os dados submetidos à análise de variância, (teste F, P<0,05).

4.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência de JIs de *H. baujardi* LPP7 na embriogênese de *M. mayaguensis*.

As condições experimentais não afetaram a quantidade de ovos significativa em relação a ovos vivos ($P < 0,05$) (Tabela 1). Foi possível, portanto, avaliar a embriogênese de *M. mayaguensis* na presença ou ausência de JIs de *H. baujardi* LPP7.

Tabela 1. Número de ovos com formação de J₂, vivos e mortos na presença ou ausência de JIs de *H. baujardi* LPP7.

Tratamentos	J2	Ovos Vivos	Ovos Mortos
Ovos + LPP7	13	10	2
Ovos	15	9	1

Dos 25 ovos submetidos à presença de JIs de *H. baujardi* LPP7, 13 completaram a embriogênese, 10 permaneceram vivos ao final do experimento, mas não completaram a embriogênese e dois morreram (Figura 2). Estes resultados não diferenciaram da testemunha ($P < 0,05$).

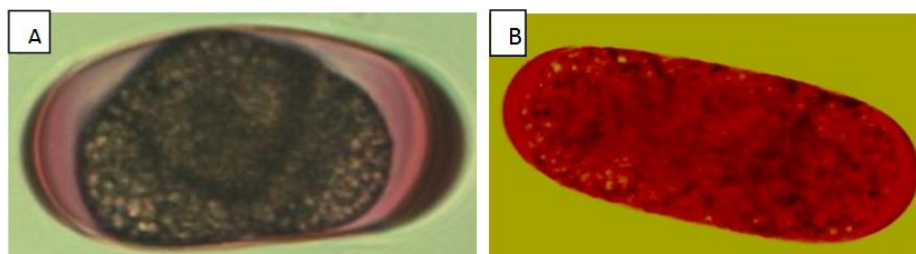


Figura 2. Ovos de *M. mayaguensis* (A) vivos e (B) mortos após exposição a phloxina B.

Influência de JIs *H. baujardi* LPP7 na eclosão de J2 de *M. mayaguensis*.

A eclosão de 100% dos ovos com J₂ na testemunha propiciou avaliar a eclosão dos J₂ na presença de JIs *H. baujardi* LPP7 nas condições experimentais (Figura 3).

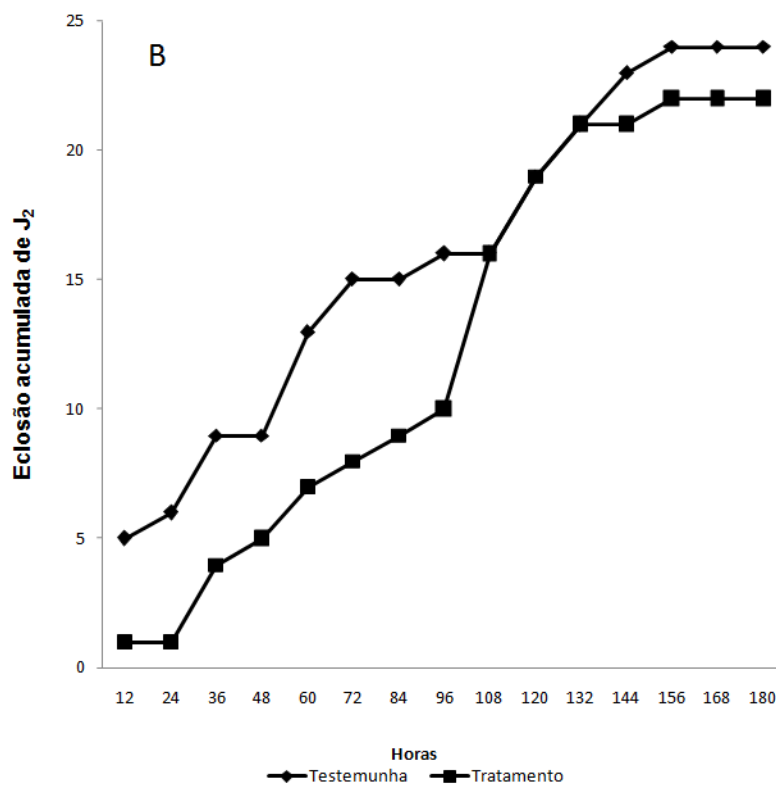
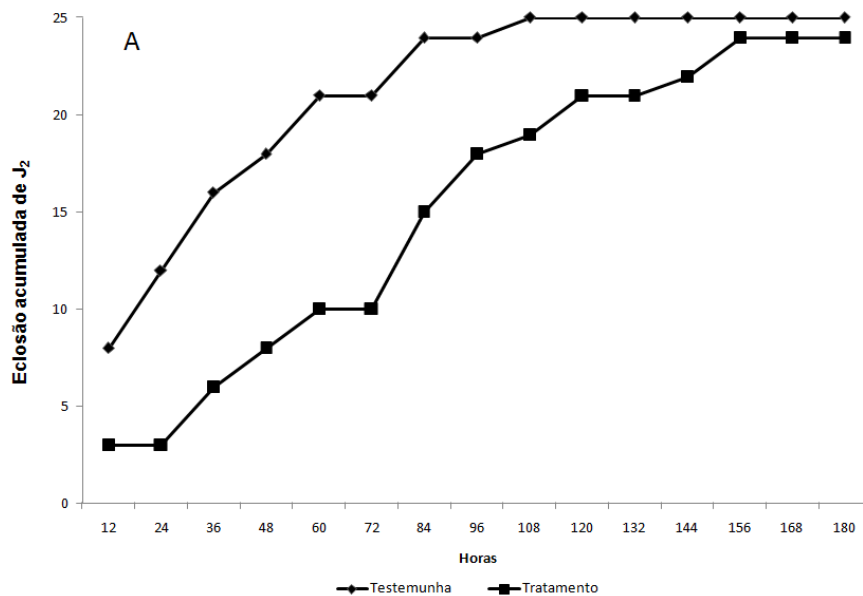


Figura 3 A e B. Eclosão de J₂ de *M. mayaguensis* em função do tempo na presença ou ausência de *Heterorhabditis baujardi* LPP7. A: Primeiro ensaio; B: segundo ensaio.

O atraso ocorrido no período de 24-72 horas ($P < 0,05$) indicou que possivelmente JIs de *H. baujardi* LPP7 e/ou suas bactérias simbióticas têm efeito tóxico sobre *M. mayaguensis*, retardando a eclosão dos ovos com J₂. No entanto,

o efeito não se mostrou constante, pois após as 72 horas houve recuperação crescente na eclosão dos J₂. Como os JIs mostraram características vitais durante todo o período necessário a eclosão dos J₂, foi necessário verificar também a presença de *P. luminescens* nas condições experimentais.

O teste de bioluminescência revelou que JIs de *H. baujardi* LPP7 liberaram suas bactérias simbiotes durante a eclosão dos J₂ de *M. mayaguensis* (Figura 4). No entanto, foi verificada liberação em massa *Photorhabdus* sp. apenas nas primeiras 24 horas de avaliação e um decréscimo das bactérias após esse mesmo período (Figura 5).

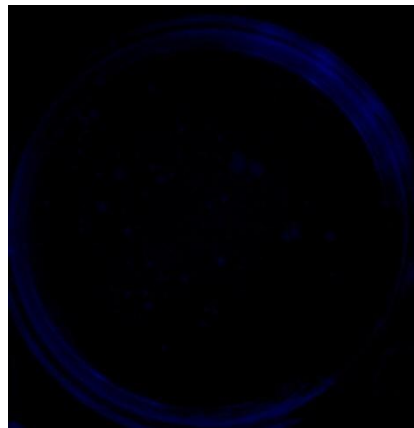


Figura 4. *Photorhabdus* sp. proveniente do tratamento com juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 mais ovos com J₂ de *Meloidogyne mayaguensis* em placa de Petri com meio NA.

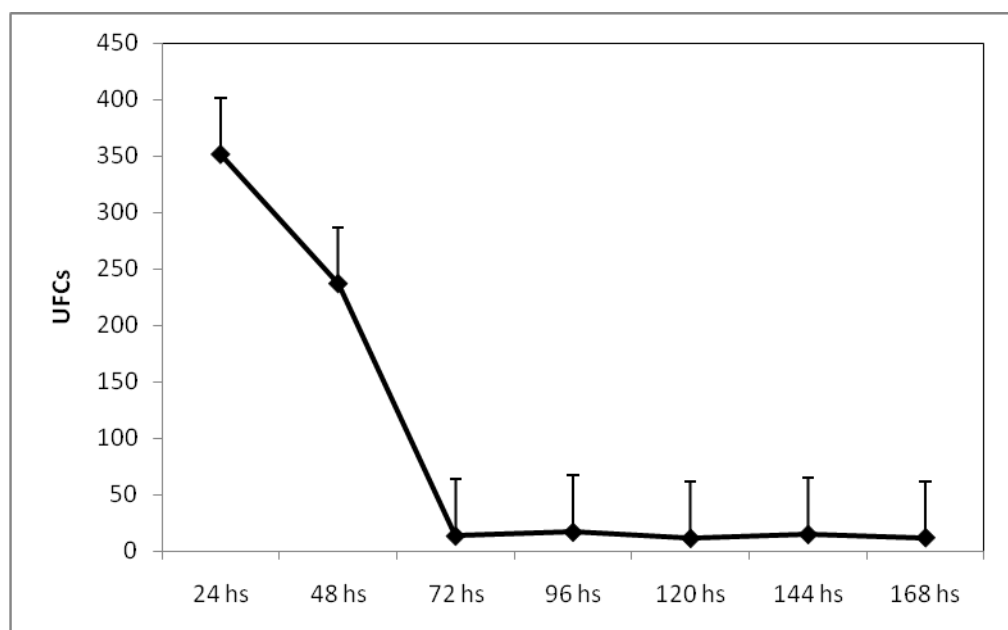


Figura 5. Avaliação de UFC's de *Photorhabdus* sp. na água presente nas lâminas com ovos (J2) de *M. mayaguensis* mais juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

Os resultados indicam que a presença de *Photorhabdus* sp. retardam a eclosão de ovos com J₂ de *M. mayaguensis*, possivelmente pela liberação de moléculas com efeito tóxico (Grewal *et al.*,1999; Hu *et al.*,1999). Molina *et al.* (2007), ao verificar menor número de galhas em plantas inoculadas com fitonematóides e NEPs sugeriram que a supressão pode estar ligada à redução da eclosão dos ovos dos fitonematóides. Ovos de *M. mayaguensis* servem como estímulo para liberação de *P. luminescens* (Ferreira *et al.*, 2009). Ovos de fitonematóides com J2 são permeáveis (Perry *et al.*,1992; Ellenby, 1974; Wallace, 1968). Uma vez em contato com os ovos com J₂ de *M. mayaguensis*, a bactéria pode liberar suas moléculas protéicas que podem ter interferido no processo de eclosão dos J₂, pois essas moléculas liberadas por *P. luminescens* já se mostraram tóxicas a células-alvo em outros microrganismos (Sharma *et al.*, 2002). A presença da bactéria nas condições experimentais não foi constante. De forma semelhante, Burnell e Stock (2000) também verificaram declínio de bactérias entomopatogênicas liberadas no solo. Com o declínio das bactérias no ambiente e possivelmente o declínio das moléculas liberadas por *P. luminescens*, os ovos com J₂ retornaram seu processo de eclosão.

Lewis *et al.* (2001) verificaram redução na eclosão de ovos de *M. incognita* que foram extraídos de raízes plantadas em areia previamente inoculada com JIs de *S. feltiae* e armazenados em água por uma semana. Esses resultados diferem do resultado do presente trabalho possivelmente pela utilização de populações heterogêneas de ovos, embora concorde que a exposição adicional de NEPs pode aumentar as chances de redução na eclosão dos ovos.

Não houve efeito de JIs de *H. baujardi* LPP7 e/ou suas bactérias simbióticas sobre a embriogênese de *M. mayaguensis*. Esse fato pode estar relacionado à impermeabilidade dos ovos durante a embriogênese, pois segundo Bird e Bird (1981), ovos de *M. javanica* em processo embriogênico mostram-se impermeáveis a reagentes químicos. No entanto, após a embriogênese os J₂ tornam-se suscetíveis a componentes químicos, o que possivelmente justifica a falta de efeito dos NEPs na embriogênese e o atraso na eclosão dos J₂. Quanto

aos ovos que estavam vivos, mas não se desenvolveram até a completa formação do J₂, estes podem ter entrado em processo de diapausa como já relatado por Guiran (1979); Jones (1998); Wright e Perry (2006), ou em dormência (Ishibashi *et al.*, 1960).

Conclui-se que o retardo na eclosão pode estar relacionado com a liberação de bactérias simbiotes do gênero *Photorhabdus* sp. por *H. baujardi* LPP7. No entanto, outros estudos que comprovem o efeito dos NEPs na infecção e na prolificidade de *M. mayaguensis* são necessários para entender melhor a relação entre NEPs e fitonematóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRD, A.F., (1986) Changes associated with parasitism in nematodes. III. Ultrastructure of the egg shell, larval cuticle, and contents of the subventral oesophageal glands in *Meloidogyne javanica* with some observations on hatching. *Journal of Parasitology* 54, 457-489.
- BURNELL A. M. e STOCK P., (2000) Heterorhabditis, Steinernema and Their Bacterial Symbionts – Lethal Pathogens of Insects. *Nematology* 2(1): 31-42.
- ELLENBY, C. (1974). Water uptake and hatching in the potato cyst nematode *Heterodera rostochiensis*, and the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. exp. Biol.* 61, 773-79.
- FERREIRA, T. F., SOUZA, R. M.; DOLINSKI, C. M. (2009a) The release of the symbiotic bacteria *Photorhabdus luminescens* by *Heterorhabditis baujardi* LPP7 is equally stimulated by *Meloidogyne mayaguensis* J2, insect larvae and tomato roots, 2^o Congresso Internacional de Nematologia Tropical. Resumos, p. 31.
- GREWAL, P. S., LEWIS, E. E. and VENTACHARI, S., (1999) Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1:735-743.
- GUIRAN, G., (1979) Survie des nématodes dans lessols secs et saturés d'eau: oeufs et larves de *Meloidogyne incognita*. *Revue Nematol.*, 8 : 65-77.
- Hu K, Li J, Webster JM. 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1(5):457-69.

- ISHIBASHI, N., KEGASAWA, K., and KUNII, Y., (1960). Studies on the hatching of the root-Knot nematode *Meloidogyne incognita* var. *acrita* Chitwood. I. The relation between hatching and the original egg content of egg mass. Japanese Journal of Applied Entomology 4, 249-255.
- JAGDALE, G. B., SOMASEKHAR N., GREWAL, P. S., e KLEIN, M. G., (2002). Suppression of Plant-parasitic Nematodes by Application of Live and Dead Infective juveniles of Entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on Boxwood (*Buxus ssp.*). Biological Control 24: 42-49.
- JONES, P.W., TYLKA, G.L. e PERRY, R. (1998) .In: Perry, R.N. e D.J. Wright (eds) The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes. London. CABI Publishing. pp. 181-212.
- LEWIS, E. E. e GREWAL, P. S. (2005). Effects of entomopathogenic nematodes on plante-parasitic nematodes. In: Nematodes as Biocontrol Agents (P. S. Grewal, R. U. Ehlers e D. Shapiro-Ilan, Eds.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 349-361.
- LEWIS, E. E., GREWAL, P. S. e SADENELLI, S., 2001. Interactions Betwem the *Sterneinema feltiae*-*Xenorhabdus bovienii* Insect Pathogen Complex and the root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. Biological Control 21: 55-62.
- MOLINA, J. P., DOLINSKI, C., SOUZA, R.M., LEWIS, E. E., (2007) Effect of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirschmann (Tylenchida: Meloidoginidae) Infection in Tomato Plants, Journal of Nematology 39(4):338–342. The Society of Nematologists.
- PERRY, R.N., KNOX, D.P., BEANE, J., (1992) Enzymes released during hatching of *Globodera rostochiensis* and *Meloidogyne incognita*. Fundamental and Applied Nematology, 15 (3), p. 283-288.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., NYCZEPIR, A.P., LEWIS, E.E. (2006) Entomopathogenic nematodes and bacteria applications for control of the pecan root-knot nematode, *Meloidogyne partityla*, in the greenhouse. *Journal of Nematology*. ;38:449-454.
- SHARMA, S., WATERFIELD, N., BOWEN, D., ROCHELEAU, T., HOLLAND, L., FFRENCH-CONSTANT, R., (2002). The lumicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific

- protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214(2):241–49.
- SOMASEKHAR, N., GREWAL, P.S., De NARDO E, A.B., STINNER B.R. (2002) Non-target effects of entomopathogenic nematodes on the soil nematode community. *Journal of Applied Ecology*, 39: 735-744.
- WALLACE, H. R., (1968). The influence of soil moisture on survival and hatch of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 14:231-242.
- Woodring, L. e Kaya H,K. (1988) Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. Series Bull. 331, p. 30.
- WRIGHT, D.J. e PERRY, R.N. (2006) Reproduction, physiology and biochemistry. In.: Perry, R. N.,and Moens, M. (eds) *Plant Nematology*. CAB International Wallingford UK, pp. 187-209.

4.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFICIDADE E INFECÇÃO DE J₂ DE *M. mayaguensis* NA PRESENÇA DE *H. baujardi* LPP7 EM RAÍZES DE TOMATEIRO.

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado que NEPs apresentam efeito negativo sobre fitonematóides. No entanto, ainda não se sabe ao certo se os NEPs afetariam a infecção da raiz ou a prolificidade de *M. mayaguensis*. O objetivo desse trabalho foi verificar se *H. baujardi* LPP7 interfere no processo de infecção por J₂ ou na prolificidade de J₂ *M. mayaguensis* em raízes de tomateiro. Para verificar a influência de *H. baujardi* LPP7 na infecção foram utilizados tubetes plásticos com solo arenoso cultivados com plântulas de tomate com aproximadamente 15 cm de altura e com três pares de folhas. Dois tratamentos foram avaliados: inoculação das plantas com 500 J₂ de *M. mayaguensis* e co-inoculação com 1000 JIs de *H. baujardi* LPP7. Dez plântulas (repetições) foram utilizadas/tratamento. Cinco dias após a inoculação as plantas foram retiradas dos tubetes e as raízes peneiradas para extração e contagem dos J₂. Para verificar a influência de *H. baujardi* LPP7 na prolificidade foram utilizados tubetes plásticos com substrato com plântulas

com as mesmas características relatadas no ensaio anterior. Dois tratamentos foram avaliados: inoculação das plantas com 500 J₂ de *M. mayaguensis* e inoculação com 500 J₂ de *M. mayaguensis* seguida de aplicação de 1000 JIs de *H. baujardi* LPP7 sete dias depois. Dez plântulas foram avaliadas por tratamento (repetições). Após 45 dias, as plantas foram extraídas do solo cuidadosamente e aleatoriamente 50 massas de ovos de fêmeas de *M. mayaguensis* de ambos os tratamentos foram retiradas e o número total de ovos quantificado. Foi verificado também o efeito de *H. baujardi* LPP7 na prolificidade de *M. mayaguensis* com reaplicação dos NEPs. Este ensaio foi montado e conduzido de forma semelhante ao ensaio anterior e a reaplicação dos NEPs foi feita dez dias após a primeira aplicação. Cada experimento foi repetido ao menos uma vez sob as mesmas condições. As variáveis foram submetidas à análise de variância e teste F (P<0,05). Os resultados indicam que JIs de *H. baujardi* LPP7 interferem no processo de infecção dos J₂ de *M. mayaguensis* e reduziram a produção de ovos de *M. mayaguensis* em raízes de tomateiro. Conclui-se que JIs de *H. baujardi* LPP7 interferem no processo de infecção e na produção de ovos de *M. mayaguensis*, possivelmente pela liberação de *P. luminescens* por NEPs, que conseqüentemente liberam seus metabólitos que já se mostraram tóxicos a vários outros microrganismos.

ABSTRACT

Recent studies have shown that EPNs have negative effect on Root-knot nematodes. However, it is not known for certain whether NEPs would affect the infection of the root or the prolificacy of *M. mayaguensis*. The aim of this study was to determine whether *H. baujardi* LPP7 interfere in the process of infection with J₂ or prolificacy of *M. mayaguensis* in tomato roots. To check the influence of *H. baujardi* LPP7 infection were used plastic tubes with substrate (sand, manure and soil) cultivated with tomato plants approximately 15 cm in height and with three pairs of leaves. Two treatments were evaluated: inoculation of plants with 500 J₂ of *M. mayaguensis* only and inoculation with 500 J₂ of *M. mayaguensis* followed by inoculation with 1000 JIs *H. baujardi* LPP7 seven days later. Ten seedlings (replicates) were used/treatment. Five days after inoculation the plants were removed from the tubes and the roots sieved for extraction and counting of J₂. To

check the influence of *H. baujardi* LPP7 prolificacy plastic tubes were used with substrate with tomato plants with the same characteristics reported in the previous experiment. Two treatments were evaluated: inoculation of plants with 500 J₂ of *M. mayaguensis* only and inoculation with 500 J₂ of *M. mayaguensis* followed by inoculation with 1000 J₁s *H. baujardi* LPP7 seven days later. Ten seedlings were evaluated for treatment (replications). After 45 days, the plants were carefully extracted from the ground and randomly 50 egg masses of female *M. mayaguensis* of both treatments were withdrawn and the total number of eggs measured. It was also verified the effect of *H. baujardi* LPP7 prolificacy of *M. mayaguensis* with reapplication of EPNs. This test was set up and conducted in a manner similar to the previous test and retest of EPNs was made ten days after the first application. Each experiment was repeated at least once under the same conditions. The variables were subjected for analysis of variance and F test (P <0.05). The results indicate that J₁s *H. baujardi* LPP7 interfere in the process of infection of J₂ of *M. mayaguensis* and reduced egg production of *M. mayaguensis* in tomato roots. Conclude that J₁s *H. baujardi* LPP7 interfere in the process of infection and egg production of *M. mayaguensis*, possibly by the release of *P. luminescens* by EPNs, which consequently release their metabolites that have proved toxic to many other microorganisms.

4.2.1 INTRODUÇÃO

O antagonismo entre nematoides entomopatogênicos e fitonematóides foi primeiramente documentado por Bird e Bird (1986). Nos últimos anos, diversos trabalhos têm relatado o efeito supressivo de NEPs sobre fitonematóides Ishibashi e Kondo, 1986; Ishibashi e Choi, 1991; Gouge *et al.*, 1994; Perry *et al.*, 1998; Grewal *et al.*, 1999; Shapiro-Ilan *et al.*, 2006). Segundo Jagdale (2002), a aplicação de J₁s de *S. carpocapsae* sobre fitonematóides em “boxwood” (*Buxus* spp.) reduziu a incidência de nematoides de vida livre no solo. Alguns trabalhos sugerem que o efeito supressivo possa estar ligado à competição entre os dois grupos de nematoides (Bird e Bird, 1986; Ishibashi e Kondo, 1986 e Jagdale *et al.*, 2002), outros sugerem que aleloquímicos produzidos por NEPs e/ou suas bactérias simbiotes repelem e intoxicam fitonematóides, declinando suas reações (Grewal *et al.*, 1999 e Hu *et al.*, 1999). Embora grande parte das pesquisas com aplicação de NEPs sobre fitonematóides tenha observado

diminuição nas populações de fitonematóides, as causas desse efeito ainda não são bem conhecidas.

Até o presente momento não existem relatos de avaliação do efeito de NEPs na prolificidade de fitonematóides. Alguns trabalhos demonstraram redução no número de galhas em plantas de tomate inoculadas com *M. mayaguensis* e co-inoculadas com *H. baujardi* LPP7, sugerindo que NEPs e suas bactérias simbiontes podem estar reduzindo a capacidade de infecção dos J₂ (Molina *et al.*, 2007). Lewis *et al.* (2001) também verificaram redução no número de galhas, não sendo evidenciado efeito algum sobre a penetração dos J₂ de *M. incognita* nas raízes de tomateiro co-inoculadas com NEPs. No entanto, Perez e Lewis (2004) demonstraram que a aplicação de *S. feltiae* diminuiu a penetração de *M. hapla* (Chitwood) em plantas de tomate e amendoim. Segundo Lewis e Grewal (2005), ainda há controvérsia sobre o uso de NEPs e suas bactérias simbiontes no controle de fitonematóides, o que faz necessário mais estudos que comprovem se existe efeito na penetração dos J₂ e na prolificidade de fitonematóides.

Esse trabalho teve o objetivo de examinar a influência de JIs de *H. baujardi* LPP7 na penetração dos J₂ e na prolificidade de J₂ de *M. mayaguensis*.

4.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Efeito de *H. baujardi* LPP7 na infecção dos J₂ de *M. mayaguensis*.

Nesse experimento foram utilizados tubetes plásticos com solo arenoso cultivados com plântulas de tomate com aproximadamente 15 cm de altura e com três pares de folhas.

Dois tratamentos foram avaliados: inoculação das plantas com 500 J₂ de *M. mayaguensis* somente e inoculação com 1000 JIs de *H. baujardi* LPP7 seguida de inoculação com 500 J₂ de *M. mayaguensis* 24 horas depois. Dez plântulas (repetições) foram utilizadas/tratamento. Cinco dias após a inoculação com *M. mayaguensis* as plantas foram retiradas dos tubetes, as raízes de cada planta foram individualmente lavadas em A.D.E, cortadas e colocadas em recipiente de plástico com 200 mL de água. A seguir foram agitadas e trituradas com auxílio de um liquidificador por 2 min. O conteúdo resultante foi vertido em peneiras de 60 e 500 mesh para eliminação do material vegetal e obtenção dos J₂. Os J₂ retidos na

peneira de 500 mesh foram colocados em Beker com 100 mL de água destilada para contagem.

Cada tratamento consistiu de duas repetições, as variáveis foram submetidas à análise de variância e teste F ($P < 0,05$).

Efeito de *H. baujardi* LPP7 na prolificidade de *M. mayaguensis*.

Nesse experimento foram utilizados tubetes plásticos com substrato (areia, esterco e solo) onde plântulas de tomate com aproximadamente 15 cm de altura e com três pares de folhas foram cultivadas.

Dois tratamentos foram avaliados: inoculação das plantas com 500 J2 de *M. mayaguensis* apenas e inoculação com 500 J2 de *M. mayaguensis* seguida de inoculação com 1000 JIs de *H. baujardi* LPP7 sete dias depois. Dez plântulas foram avaliadas por tratamento (repetições).

Após 45 dias, as plantas foram extraídas do solo cuidadosamente e as suas raízes foram lavadas. Aleatoriamente, 50 massas de ovos (5/plântula) de fêmeas de *M. mayaguensis* de ambos os tratamentos foram retiradas sob lupa, individualmente depositadas em tubo tipo ependorff em água e o número total de ovos quantificado sob microscópio óptico com lente 25x.

O experimento foi repetido uma vez nas mesmas condições. As variáveis foram submetidas à análise de variância e teste F ($P < 0,05$).

Efeito da reaplicação de *H. baujardi* LPP7 na prolificidade de *M. mayaguensis*.

Nesse experimento foram utilizadas unidades experimentais semelhantes ao ensaio anterior. Dois tratamentos foram avaliados: inoculação das plantas com 500 J2 de *M. mayaguensis* apenas e inoculação com 500 J₂ de *M. mayaguensis* seguido de duas inoculações de 1000 JIs de *H. baujardi* LPP7 sete e dezessete dias depois. Dez plântulas foram avaliadas por tratamento (repetições). Após sete dias, as dez plântulas co-inoculadas com *H. baujardi* LPP7 receberam o inóculo de 1000 JIs e no 17º dia foi feita uma reaplicação de *H. baujardi* LPP7, os quais foram depositados no colo das plântulas com uma pipeta em uma suspensão de 5 mL de água.

Após 45 dias, as plantas foram extraídas do solo cuidadosamente e as suas raízes foram lavadas. Aleatoriamente, 50 massas de ovos de fêmeas de *M.*

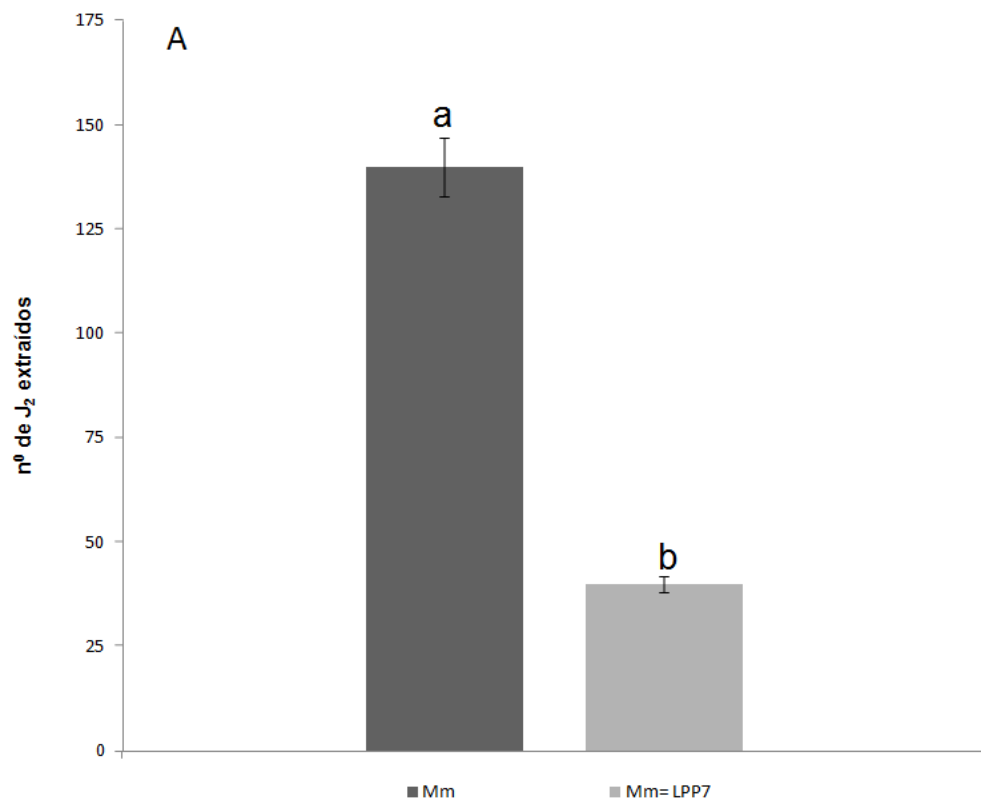
mayaguensis de cada tratamento foram retiradas sob lupa e o número total de ovos de cada massa foi quantificado.

O experimento foi repetido uma vez nas mesmas condições e os dados submetidos à análise estatística, (teste F, $P < 0,05$).

4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de *H. baujardi* LPP7 na infecção dos J₂ de *M. mayaguensis*.

Os resultados indicaram que JIs de *H. baujardi* LPP7 interferiram no processo de infecção dos J₂ de *M. mayaguensis* em raízes de tomateiro ($P < 0,05$) (Figura 6).



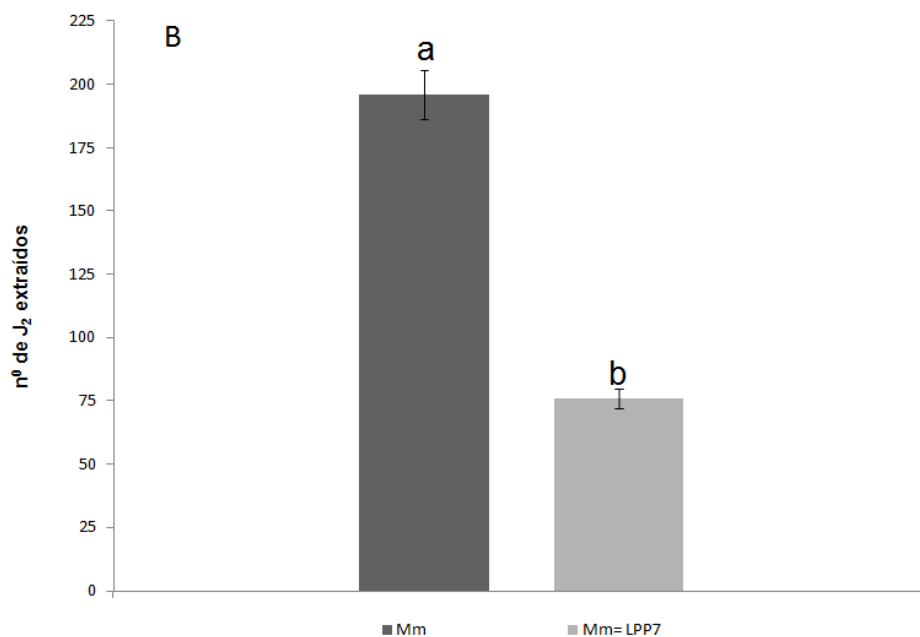


Figura 6 A, B. Número de J_2 extraídos de raízes de tomateiro quando inoculado *M. mayaguensis* (Mm) ou 24 horas após a inoculação com *H. baujardi* LPP7 (Mm + LPP7). Valores são médias de dez repetições (plantas)/tratamento. Letras diferentes indicam que existe diferença estatística significativa entre os tratamentos (teste F, $P < 0,05$). A: Primeiro ensaio; B: segundo ensaio.

Efeito de *H. baujardi* LPP7 na prolificidade de *M. mayaguensis*.

Os JIs de *H. baujardi* LPP7 reduziram a produção de ovos de *M. mayaguensis* em raízes de tomateiro ($P < 0,05$) (Figura 7).

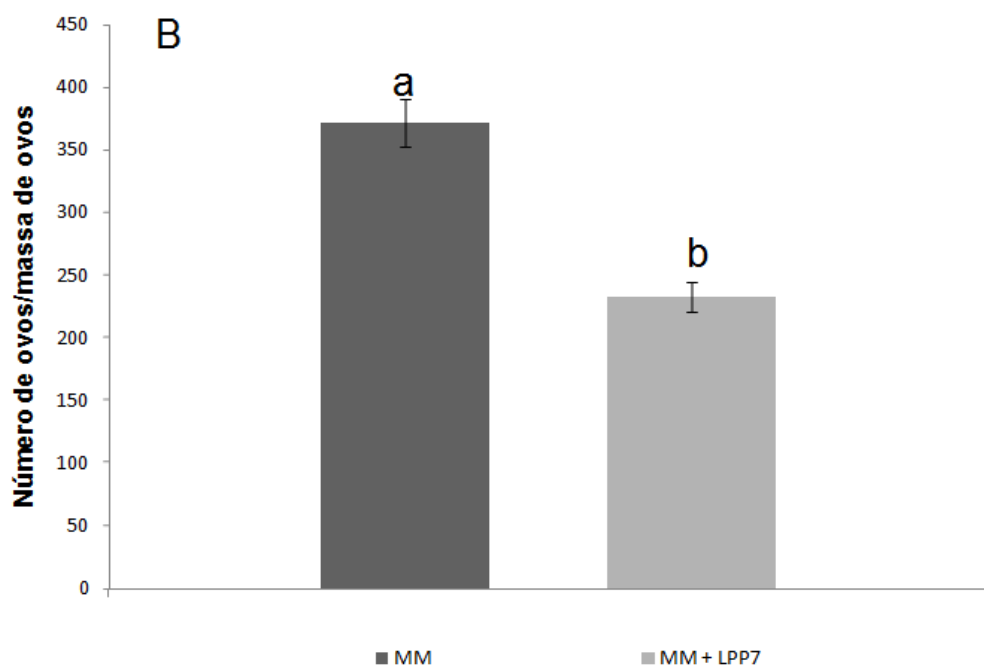
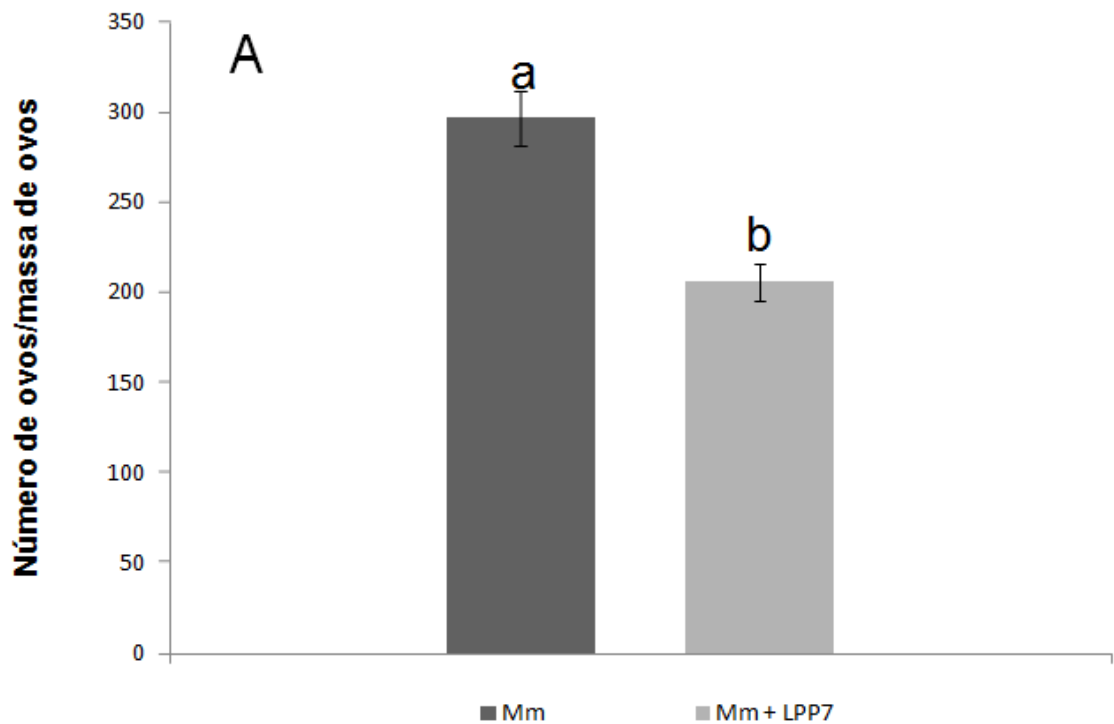


Figura 7 A, B. Número de ovos de *M. mayaguensis* por massa de ovos quarenta e cinco dias após a inoculação de plântulas de tomateiro com *M. mayaguensis* somente (Mm) ou com *H. baujardi* LPP7 (Mm + LPP7). Valores são médias de cinquenta repetições (massas de ovos)/tratamento. Letras diferentes indicam

diferença estatística significativa (teste F, $P < 0,05$). A: Primeiro ensaio; B: Segundo ensaio.

Efeito da reaplicação de JIs *H. baujardi* LPP7 na prolificidade de *M. mayaguensis*.

A reaplicação de JIs *H. baujardi* LPP7 não reduziu a prolificidade de *M. mayaguensis* em raízes de tomateiro ($P < 0,05$) em relação à aplicação única dos NEPs (Figura 8).

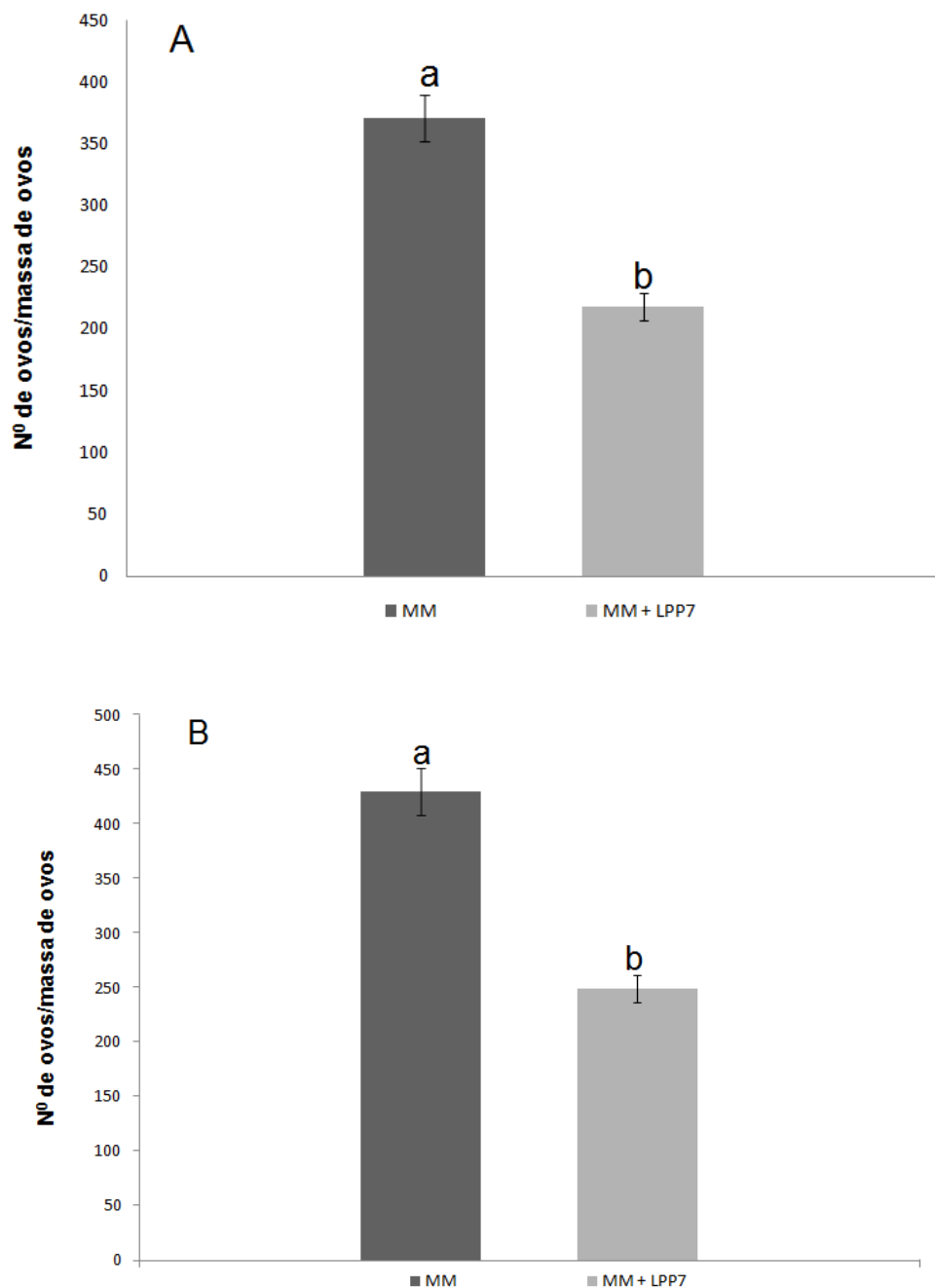


Figura 8 A, B. Número de ovos de *M. mayaguensis* por massa de ovos quarenta e cinco dias após a inoculação de plântulas de tomateiro com *M. mayaguensis* somente (Mm) ou com reaplicação de *H. baujardi* LPP7 (Mm + LPP7). Valores são médias de cinquenta repetições (massas de ovos)/tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (teste F, $P < 0,05$). A: Primeiro ensaio; B: Segundo ensaio.

A inoculação de *H. baujardi* LPP7 24 horas antes de *M. mayaguensis* reduziu as taxas de infecção do fitonematóide. Perez e Lewis (2004) demonstraram que somente pré-aplicações de *S. feltiae* uma semana antes diminuíram a penetração de *M. hapla* em tomateiros. Segundo Ferreira *et al.* (2009), ovos de *M. mayaguensis* servem de estímulo para liberação de *P. luminescens*. O efeito repelente ou tóxico de aleloquímicos produzidos por bactérias simbiotes sobre fitonematóides já foi relatado por Grewal *et al.* (1999) e Hu *et al.* (1999). Desta forma, esses agentes químicos podem estar atuando na capacidade de localização das raízes pelos J₂ de *M. mayaguensis*, ou dificultando a penetração das raízes propriamente dita.

Quanto ao efeito de *H. baujardi* LPP7 na prolificidade de *M. mayaguensis*, houve redução no número médio de ovos/massa de ovos. No entanto, a reaplicação dos NEPs não reduziu a produção de ovos se comparar ao ensaio com uma única aplicação. Possivelmente, os metabólitos liberados por bactérias simbióticas, anteriormente relatados por Grewal *et al.* (1999) e Hu *et al.* (1999), podem estar interferindo no estabelecimento do sítio de infecção por J₂ de *M. mayaguensis*, prejudicando assim a ovoposição pelas fêmeas, pois os fitonematóides teriam que se recuperar fisicamente do contato com os metabólitos tóxicos. Brugirard *et al.* (2005), em estudos de interação entre isolados de *Photorhabdus* sp. e protozoários de vida livre no solo, verificaram que esses microrganismos não foram capazes de crescer e reproduzir-se na presença de um isolado *P. luminescens*. Possivelmente, o efeito dos metabólitos bacterianos sobre *M. mayaguensis* não afetaram de forma tão drástica a produção de ovos em *M. mayaguensis* devido ao declínio da bactéria no solo ao longo do tempo, como relatado anteriormente por Burnell e Stock (2000). Sugere-se ainda que a redução da produção de ovos poderia resultar em menor taxa de reinfecção, conseqüentemente reduzindo o número de galhas radiculares, como relado por

Somasekhar *et al.* (2002), Lewis *et al.* (2001), Molina *et al.* (2007) e de massas de ovos por planta (Shapiro-Ilan *et al.*, 2006).

A redução da infecção e da prolificidade de *M. mayaguensis* pode estar relacionada com a liberação das bactérias simbióticas do gênero *Photorhabdus* sp. por *H. baujardi* LPP7 e, conseqüentemente, a presença de metabólitos tóxicos a fitonematóides no solo. Este trabalho confirma o potencial do uso de NEPs no controle biológico de *Meloidogyne* sp. em pequenas áreas ou plantios, devendo-se avançar nos estudos da metodologia de aplicação (época, dosagens, métodos) dos NEPs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRD, A.F. e BIRD, J. (1986) Observations on the use of insect parasitic nematodes as a means of biological control of root-knot nematodes. *International Journal for Parasitology*, v.16, p.511.
- BIRD, A.F. e BIRD, J. (1986) Observations on the use of insect parasitic nematodes as a means of biological control of root-knot nematodes. *International Journal for Parasitology*, v.16, p.511.
- FERREIRA, T. F., SOUZA, R. M.; DOLINSKI, C. M. (2009) The release of the symbiotic bacteria *Photorhabdus luminescens* by *Heterorhabditis baujardi* LPP7 is equally stimulated by *Meloidogyne mayaguensis* J2, insect larvae and tomato roots, 2º Congresso Internacional de Nematologia Tropical. Resumos, p. 31.
- GOUGE, D.H., OTTO, A.A., SCHIROCKI, A., HAGUE, N.G.M., (1994) Effects of steinernematids on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Ann. Appl. Biol.* 124 (Suppl), 135–143.
- GREWAL, P. S., LEWIS, E. E. and VENTACHARI, S., (1999) Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1:735-743.
- GREWAL, P. S., LEWIS, E. E. and VENTACHARI, S., (1999) Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1:735-743.

- HU K, LI, J., E WEBSTER JM. 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1(5):457–69.
- ISHIBASHI, N. e KONDO, E., (1986). *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: Persistence in Soil and Bark Compost and their Influence on native nematodes. *J. Nematol.* 18: 310-316.
- ISHIBASHI, N. e KONDO, E., (1986). *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: Persistence in Soil and Bark Compost and their Influence on native nematodes. *J. Nematol.* 18: 310-316.
- ISHIBASHI, N. e CHOI, D.R., (1991). Biological control of soil pests by mixed application of entomopathogenic and fungivorous nematodes. *J. Nematol.* 23, 175–181.
- JAGDALE, G. B., SOMASEKHAR N., GREWAL, P. S., e KLEIN, M. G., (2002). Suppression of Plant-parasitic Nematodes by Application of Live and Dead Infective juveniles of Entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on Boxwood (*Buxus ssp.*). *Biological Control* 24: 42-49.
- JAGDALE, G. B., SOMASEKHAR N., GREWAL, P. S., e KLEIN, M. G., (2002). Suppression of Plant-parasitic Nematodes by Application of Live and Dead Infective juveniles of Entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on Boxwood (*Buxus ssp.*). *Biological Control* 24: 42-49.
- LEWIS, E. E. e GREWAL, P. S. (2005). Effects of entomopathogenic nematodes on plante-parasitic nematodes. In: *Nematodes as Biocontrol Agents* (P. S. Grewal, R. U. Ehlers e D. Shapiro-Ilan, Eds.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 349-361.
- LEWIS, E. E., GREWAL, P. S. e SADENELLI, S., 2001. Interactions Between the *Sterneinema feltiae*-*Xenorhabdus bovienii* Insect Pathogen Complex and the root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Biological Control* 21: 55-62.
- MOLINA, J. P., DOLINSKI, C., SOUZA, R.M., LEWIS, E. E., (2007) Effect of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirschmann (Tylenchida: Meloidoginidae) Infection in Tomato Plants, *Journal of Nematology* 39(4):338–342. The Society of Nematologists.

- PEREZ, E. E. e LEWIS, E. E., 2004. Suppresión of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* with Entomopathogenic nematodes on Greenhouse Peanuts and Tomatoes. *Biological Control* 30: 336-341.
- PERRY, R.N., HOMINICK, W.M., BEANE, J. e BRISCOE, B., (1998). Effects of the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *S. carpocapsae* on the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in pot trials. *Biocontr. Sci. Technol.* 8, 175–180.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., GOUGE D.H., PIGGOTT S.J., FIFE J.P., (2006) Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol. Control* 38: 124–133.
- BRUGIRARD-RICAUD, K., DUCHAUD, E., GIVAUDAN, A., GIRARD, P.A., KUNST, F., (2005) Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell Microbiol.* 7(3):363–71.

5 RESUMO E CONCLUSÕES

Os juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7, as bactérias *Photorhabdus* sp. ou seus metabólitos não têm efeito sobre a embriogênese de *M. mayaguensis*, possivelmente pela baixa permeabilidade dos ovos. O mesmo não aconteceu em ovos com J₂, onde ocorreu retardo na eclosão que possivelmente está relacionada à liberação de bactérias simbióticas por *H. baujardi* LPP7.

Os resultados deste trabalho também indicam que JIs de *H. baujardi* LPP7 interferem no processo de infecção dos J₂ de *M. mayaguensis* e reduziram a produção de ovos de *M. mayaguensis* em raízes de tomateiro.

Conclui-se que JIs de *H. baujardi* LPP7 interferem no processo de infecção e na produção de ovos de *M. mayaguensis*, possivelmente pela liberação de *P. luminescens* por NEPs, que conseqüentemente liberam seus metabólitos que já se mostraram tóxicos a vários outros microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B. J. e NGUYEN, K. B., (2002). Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (Ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI, New York. p. 1-28.
- AKHURST, R. e BOEMARE, N. E., (1990) Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*
In:Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, CRC Press, Boca Raton, p. 75–87.
- AKHURST, R. e BOEMARE, N. E., (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*
In:Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, CRC Press, Boca Raton, p. 75–87.
- AKHURST, R. J., (1980) Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. Journal of General Microbiology 121: 303-309.
- AKHURST, R. J., (1982) Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. J. Gen. Microbiol. 128: 3061-3065.
- ALVES, V. S. (2006) Biologia e controle da cochonilha-da-raiz-docafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras, 118p.

- ANÔNIMO. (2006) Praga gera forte queda no cultivo da goiaba. *Atualidades Agrícolas*, junho, p. 26.
- BINTRIM, S.B. E ENSIGN, J.C., (1998) Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes. *J. Bacteriol.* 180(5):1261–69.
- BIRD, A. F. (1959) The attractiveness of rots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica* 4, 322-335.
- BIRD, A.F. e BIRD, J. (1986) Observations on the use of insect parasitic nematodes as a means of biological control of root-knot nematodes. *International Journal for Parasitology*, v.16, p.511.
- BIRD, A.F. and McCLURE, M.A. (1976). The Thlenchid (Nematoda) eggshell: structure, composition and permeability. *Parasitology* 72, 19-28.
- BIRD, A. F. e SOEFFICAY., (1972). Changes in the ultrastructure of the gelatinous matrix of *Meloidogyne javanica* during dehydration. *J. Nematol.*, 4 : 166-169.
- BOEMARE, N. E., GIVALDAM, A., BREHELIN, M., and LAUMOND C., (1997) Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. *Symbiosis* 22: 21-45.
- BOEMARE, N.,E., AKHURST, R. J., e MOURANT, R. G., (1993) DNA Relatedness between *Xenorhabdus* spp., Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes and a Proposal to Transfer *Xenorhabdus luminescens* to a New Genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 249-255.
- BRITO, J., INSERRA, R., LEMAN, P., DIXON, W., (2003). The root knot nematode, *Meloidogyne mayaguensis*. Homepage: <http://.doacs.state.fl.us/~pi/nema/m~mayaguesia.htm>.
- BRUGIRARD-RICAUD K., DUCHAUD, E., GIVAUDAN, A., GIRARD, P.A., KUNST, F., (2005) Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell Microbiol.* 7(3):363–71
- BURLA, R., SOUZA, R.M., GONÇALVES Jr, E. e PEREIRA, F.O.M., (2007). Reação de acessos de *Psidium spp.* a *Meloidogyne mayaguensis*. 12^o semana de iniciação científica, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.
- BURNELL A. M. e STOCK P., (2000) Heterorhabditis, Steinernema and Their Bacterial Symbionts – Lethal Pathogens of Insects. *Nematology* 2(1): 31-42.

- CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A., (2008) Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.29-33.
- CAMPOS, V.P., (1997) Nematoides na cultura da figueira. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.18, n.188, p.33-38.
- CAMPOS, V.P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N.C., (1990) Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford: CAB International, p.387-430.
- CAPINERA J. L., e EPSKY N. D., (1992) Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. *The Florida Entomologist*, Gainesville, v. 75, n. 4, p. 525-532.
- CARNEIRO R. M. D. G., MOREIRA, W.A., ALMEIDA, M.R.A., e GOMES, A. C. M. M., (2001) Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em Goiabeira no Brasil. *Nematologia Brasileira*. 25: 223-228.
- CARNEIRO, R.M.D.G., (2003) Uma visão mundial sobre a ocorrência e patogenicidade de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e outras culturas. *Resumos XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia*, p. 22.
- CARNEIRO, R.M.D.G., Almeida M.R.A., Quénéhervé, P. (2000) Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations, *Nematology* 2(6):645-654.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CIROTTO, P.A.; QUINTANILHA, A.P.; SILVA, D.B.; CARNEIRO, R.G. (2007) Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.281-284.
- COSTA, D.C., (2000) Doenças causadas por nematoides. In: CORDEIRO, Z.J.M. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. p. 66-77.
- COUILLAULT, C. and EWBANK, J. J., (2002) Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infect. Immun.* 70, 4705–4707.
- DE GUIRAN, G. e VILLEMIN, M.A., (1980) Spécificité de la diapause embryonnaire des oeufs de *Meloidogyne* (Nematoda). *Revue de Nématologie* 3:115-121.

- DECKER, H. e RODRIGUEZ F. M. E., (1989). The occurrence of root gall nematodes *Meloidogyne mayaguensis* on *Coffea arabica* in Cuba. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Wilhelmpieck, Universitat, Rostock, Naturwissenschaftliche Reihe* 38, p. 32.
- DEL VALLE, E. E., DOLINSKI, C., SOUZA, R. M., SAMUELS, R. I. (2005a) Avaliação de Metodologias de Seleção para Tolerância a Elevadas Temperaturas em *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). *Nematol. Bras.* 29: 207-214.
- DEL VALLE, E. E., DOLINSKI, C., SOUZA, R.M., SAMUELS, R.I., (2005b). Performance de *Heterorhabditis baujardi* LPP7(28) (Nematoda: Rhabditida), Seleccionada para Tolerância a Elevadas Temperaturas, no Controle de *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematol. Bras.* 29: 199-205.
- DEL VALLE, E.E., DOLINSKI, C., SOUZA, R.M., (2008a) Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. *Int. J. Pest Manag.* 54(2): 115-122.
- DEL VALLE, E.E., DOLINSKI, C., BARRETO, E.L.S, SOUZA R.M., SAMUELS, R.I. (2008b) Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Bio. Sci. e Tech.* 18(1): 33-41.
- DOLINSKI, C., DEL VALLE, E. E., STUART R. J., (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* 72 (Coleoptera:Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control* 38: 422–427.
- DOLINSKI, C.; KAMITANI, FERNANDO L.; MACHADO, I. R. and WINTER, C. E., (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. vol.103, n.2, pp. 150-159. ISSN 0074-0276.
- DROPKIN, V.H., (1976) Nematodes parasites of plants, their ecology and the process of infection. In.: HEITEFUSS, R. e WILLIAMS, P.H. eds. *Physiological Plant Pathology*. Berlin, Springer, p. 222-246

- EISENBACK, J. D. and TRIANTAPHYLLOU, H. (1991) Root-Knot Nematodes *Meloidogyne* species and races in: Nickle, W. R. (ed) Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, New York, pp. 191-274.
- Ellenby, C. (1963). *Experientia*, 19, 256.
- ELLENBY, C. (1974). Water uptake and hatching in the potato cyst nematode *Heterodera rostochiensis*, and the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. exp. Biol.* 61, 773-79.
- FERREIRA, T. F., 2007. Avaliação da liberação da bactéria *Photorhabdus luminescens* do nematoide *Heterorhabditis baujardi* LPP7 na presença do nematoide fitoparasita *Meloidogyne mayaguensis* e de outros estímulos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- FERREIRA, T. F., SOUZA, R. M.; DOLINSKI, C. M. (2009a) The release of the symbiotic bacteria *Photorhabdus luminescens* by *Heterorhabditis baujardi* LPP7 is equally stimulated by *Meloidogyne mayaguensis* J2, insect larvae and tomato roots, 2º Congresso Internacional de Nematologia Tropical. Resumos, p. 31.
- FERREIRA, T.F.; DOLINSKI, C.M.; SOUZA, R.M.; ALMEIDA, A.M., (2009b). Avaliação da tolerância de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 a diferentes soluções esterilizantes. 2º Congresso Internacional de Nematologia Tropical. Resumos, p. 34.
- FISCHER-LE S. M., VIALARD, V., BRUNEL, B., (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; 49: 1645–1656.
- FORST, S., e CLARK, D., (2002) Bacteria – Nematode Symbiosis in: Glaugler, R., Entomopathogenic Nematology. Boca Raton, FL. CRC Press, p. 57-77.
- FORST, S.; DOWDS B.; BOEMARE N.; e STACKEBRANDT, E., (1997) *Xenohabdus* and *Photorhabdus* SP.: Bugs that Kill Bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 47-72.
- FREIRE, F.C.O.; FERRAZ, S., (1977) Resistência de cultivares de feijoeiro a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e influência da temperatura e exsudatos

- radiculares sobre a eclosão de seus juvenis. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 24, n. 133, p. 247-260.
- GAUGLER, R. e HAN, R., (2002) Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 289-310.
- GAUGLER, R., L.; LEBECK, B.; NAKAGAKI, and BOUSH G. M., (1980) Orientation of the entomogênous nematode *Neoaplectana carpocapsae* to carbon dioxide. *Environ. Entomol.* 9: 649-652.
- GOMES, V. M., SOUZA R. M., SILVA M. M. e DOLINSKI C. M., (2008) Caracterização do estado nutricional de goiabeiras em declínio parasitadas por *Meloidogyne mayaguensis*. *Nematologia Brasileira*, 32: 154-160.
- GOMES, V.M., (2007) Meloidoginose da goiabeira: estudos sobre a sua patogênese e formas de convívio com a doença a campo. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, p.33.
- GONÇALVES, W., SILVAROLLA, M.B., (2001) Nematoides parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. (ed.) *Tecnologias de produção de café com qualidade*. Editora UFV, Viçosa. p.199-268.
- GÖTZ, P., (1986) Encapsulation in arthropods. In: Brehelin, M. (Ed.), *Immunity in Invertebrates*. Springer, Berlin, p. 153–170.
- GOUGE, D.H., OTTO, A.A., SCHIROCKI, A., HAGUE, N.G.M., (1994) Effects of steinernematids on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Ann. Appl. Biol.* 124 (Suppl), 135–143.
- GOURD, T. R., D. P. SCHMITT e BARKER K. R., (1993) *Penetration rates by second-stage juveniles of Meloidogyne spp. and Heterodera glycines into soybean roots. Journal of Nematology*, 25 (1): 38-41.
- GREWAL, P. S., LEWIS, E. E. and VENTACHARI, S., (1999) Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1:735-743.
- GUIRAN, G., (1979) Survie des nématodes dans lessols secs et saturés d'eau: oeufs et larves de *Meloidogyne incognita*. *Revue Nematol.*, 8 : 65-77.
- HAN, R., e EHLERS, R. U., (2001) Effect of *Photorhabditis luminescens* Phase variants on the in vivo and in vitro Development and reproduction of the

- entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *Microbiology Ecology* 35: 239-386.
- HAZIR, S., KESKIN, N., STOCK, S. P., KAYA, H. K. OZCAN, S., (2003) Diversity in Distribution of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. *Biodiv. Conserv.*12: 375-386.
- HAZIR, S., STACKEBRANDT, E., LANG, E., SCHUMANN, P., EHLERS, R.-U. e KESKIN, N. (2004) Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis* subsp. nov. *Syst Appl Microbiol* 27, 36–42.
- HOFFMANN, D., HOFFMANN J.A., (1990) Cellular and molecular aspects of insect immunity. *Res. Immunol.* 141: 895-896
- HU K, LI, J., E WEBSTER JM. 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1(5):457–69.
- Hu, K., Li, J. and Webster J.M., (1995) Mortality of plant parasitic nematodes caused by bacterial (*Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus luminescens*) culture media. *J. Nematol* 27:502–503 (Abstract).
- HU, K., Li, J., WANG, W., WU, e LIN, H., and WEBSTER, J.M., (1998) Comparison of metabolites produced in vitro and in vivo by *Photorhabdus luminescens*, a bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*. *Can. J. Microbiol.* 44: 1072-1077.
- ISHIBASHI, N. e KONDO, E., (1986). *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: Persistense in Soil and Bark Compost and their Influence on native nematodes. *J. Nematol.* 18: 310-316.
- ISHIBASHI, N. e CHOI, D.R., (1991). Biological control of soil pests by mixed application of entomopathogenic and fungivorous nematodes. *J. Nematol.* 23, 175–181.
- ISHIBASHI, N., KEGASAWA, K., and KUNII, Y., (1960). Studies on the hatching of the root-Knot nematode *Meloidogyne incognita* var. *acrita* Chitwood. I. The relation between hatching and the original egg content of egg mass. *Japanese Journal of Applied Entomology* 4, 249-255.

- JAGDALE, G. B., SOMASEKHAR N., GREWAL, P. S., e KLEIN, M. G., (2002). Suppression of Plant-parasitic Nematodes by Application of Live and Dead Infective juveniles of Entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on Boxwood (*Buxus ssp.*). *Biological Control* 24: 42-49.
- JONES, P.W., TYLKA, G.L. e PERRY, R. (1998) .In: Perry, R.N. e D.J. Wright (eds) *The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes*. London. CABI Publishing. pp. 181-212.
- KAWAE, L. (2006). Levantamento de propriedades que apresentam o nematoide-dasgalhas. Secretaria de Estado de Agricultura, Abastecimento, Pesca e Desenvolvimento do Interior, Superintendência de Defesa Sanitária, 1 p.
- KAYA, H. K., e GAUGLER, R., (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- KLEIN, M., (1990). Efficacy Against Soil-inhabiting Insects. In GAUGLER, R., KAIA, H.K. *Entomopathogenic Nematodes In Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, p. 195-214.
- LEE, D.L. e ATKINSON, H.J., (1977) *Physiology of nematodes*. 2nd ed. New York: Columbia University Press.
- LEWIS E. E. (2002) Behavioral Ecology. In: Gaugler R, editor. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. p 205–224.
- LEWIS, E. E. e GREWAL, P. S. (2005). Effects of entomopathogenic nematodes on plante-parasitic nematodes. In: *Nematodes as Biocontrol Agents* (P. S. Grewal, R. U. Ehlers e D. Shapiro-Ilan, Eds.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 349-361.
- LEWIS, E. E. e GREWAL, P. S. (2005). Effects of entomopathogenic nematodes on plante-parasitic nematodes. In: *Nematodes as Biocontrol Agents* (P. S. Grewal, R. U. Ehlers e D. Shapiro-Ilan, Eds.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 349-361.
- LEWIS, E. E., GREWAL, P. S. e SADENELLI, S., 2001. Interactions Between the *Sterneinema feltiae-Xenorhabdus bovienii* Insect Pathogen Complex and the root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Biological Control* 21: 55-62.
- Li-CHEN, J.C.G, WEBSTER, J.M., CZYZEWSKA E., (1995) Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J. Nat. Prod.* 58(7):1081–86
- LIMA, I. M., C.M. DOLINSKI e R.M. SOUZA., (2003). Dispersão de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabais de São João da Barra (RJ) e relato de novos

- hospedeiros dentre plantas invasoras e cultivadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXIV, Petrolina. Resumos, p. 139.
- MACHADO, I.R.; MINAS, R.S., DOLINSKI, C.M. (2009 a) Avaliation of posture weight and weight of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sensitive and resistant strain after entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* LPP4 and *H. baujardi* LPP7 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) application. 2º Congresso Internacional de Nematologia Tropical. Resumos, p. 27.
- MACHADO, I.R.; MINAS, R.S.; DOLINSKI, C.M. (2009 b) Influence of *Heterorhabditis indica* LPP4 and *H. baujardi* LPP7 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) on the pré posture and posture periods of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sensitive and resitive and resistant strains. 2º Congresso Internacional de Nematologia Tropical. Resumos, p. 30.
- MASLER, E.P., (2008) Responses of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* to exogenously applied biogenic amines. Nematology, Volume 10, Number 6, pp. 911-917(7).
- MELO, L. A. (1995) Um modelo para identificação de nematoides através da estrutura do estilete. Trabalho individual submetido ao curso de pós-graduação em Ciências da Computação, universidade de Santa Catarina. Dezembro, Florianópolis.
- MEYER, S.L.F., ZASADA, I.A., ROBERTS, D.P., VINYARD B.T., LAKSHMAN D.K., LEE, J.K., CHITWOOD, D.J., and CARTA L.K., (2006) *Plantago lanceolata* and *Plantago rugelii* Extracts are Toxic to *Meloidogyne incognita* but not to Certain Microbes. Journal of Nematology. September; 38, 333–338.
- MOLINA, J. P., DOLINSKI, C., SOUZA, R.M., LEWIS, E. E., (2007) Effect of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirschmann (Tylenchida: Meloidoginidae) Infection in Tomato Plants, Journal of Nematology 39(4):338–342. The Society of Nematologists.
- MOLINA, J. P. A. (2008), Estudos das interações entre o fitonematoide *Meloidogyne mayaguensis* (Tylenchida: Meloidoginidae) e nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditae).

- Dissertação de Doutorado. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- MOREIRA, W. A., e HENRIQUES, N. D., (2001). Ataque do nematoide das galhas (*Meloidogyne mayaguensis*) a mudas de goiabas obtidas por estaquia e enxertia. Comunicado técnico nº107, Embrapa Semi Árido.
- MOREIRA, W. A., e HENRIQUES, N.D., 2001. Ataque do nematoide das galhas (*Meloidogyne mayaguensis*) a mudas de goiabas obtidas por estaquia e enxertia. Comunicado técnico nº107, Embrapa Semi Árido.
- MOREIRA, W.A., NETO, D.H., BARBOSA, F.R., MOURA, A.O. e PAULA, F.R. (2001) Desenvolvimento populacional de *Meloidogyne* spp. em mudas de goiabeira estaqueadas e enxertadas tratadas com nematicidas. XXIII Congresso Brasileiro de Nematologia, Resumos, p. 111.
- MOURA, R.M. e MOURA, A.M. (1989) Meloidoginose da goiabeira: doença de alta severidade no Estado de Pernambuco, Brasil. Nematol. Bras. v.13, p.13-19.
- MOURA, R.M., MARANHÃO, S.R.V.L., COELHO, R.S.B., CAVALCANTI, V.A.L.B., BEZERRA, J.E.F., LEDERMAN, I.E., FRANÇA, J.G.E., FREITAS, J.L., NEVES, J.D., MOREIRA, W. e NETO, L.G. (2003). O nematoide da goiabeira (*Psidium guajava* L.) IPA Responde, publicação on-line.
- NAGESH, M., HUSSINE, S. S., e SINGH P., (2001) Isolation and Characterization of Symbiotic Bacteria from *Heterorhabditis* spp. And *Steinernema carpocapsae* WEISER. Pest Management in Horticultural Ecosystems 8 (1): 38-42.
- OOSTENDORP, M. e R.A. SIKORA. (1990) *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. Revue de Nématologie, 14: 269-274.
- PEREIRA, F. O. M., SOUZA, R. M. ; SOUZA, P. M., DOLINSKI, C., SANTOS, G. K. (2009) Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiabeira no Brasil. 2^o Congresso Internacional de Nematologia Tropical. Resumos, p. 20.
- PEREZ, E. E. e LEWIS, E. E., 2004. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* with Entomopathogenic nematodes on Greenhouse Peanuts and Tomatoes. Biological Control 30: 336-341.

- PERRY, R.N. and AUMANN, J. (1998) Behaviour and sensory responses. In: Perry, R. N. AND WRIGHT D. J. (eds) Free-living and Plant-Parasitic Nematodes. CAB International Wallingford UK, p. 75-102.
- PERRY, R.N., HOMINICK, W.M., BEANE, J. e BRISCOE, B., (1998). Effects of the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *S. carpocapsae* on the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in pot trials. Biocontr. Sci. Technol. 8, 175–180.
- PERRY, R.N., KNOX, D.P., BEANE, J., (1992) Enzymes released during hatching of *Globodera rostochiensis* and *Meloidogyne incognita*. Fundamental and Applied Nematology, 15 (3), p. 283-288.
- POINAR, G. O.; Jr., (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R. e H. K. KAYA (eds). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton, Fl. CRC Press, p. 23-61.
- PREMACHANDRAN, D., von MENDE, N., HUSSEY, R.S. and McCLURE, M.A., (1968) A method for staining nematode secretions and structures. Journal of Nematology 20, 70-78.
- RAMMAH, A. e HIRSCHMANN, H. (1988). *Meloidogyne mayaguensis* sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode from Puerto Rico. Journal of Nematology 20: 58-69.
- RICHARDSON, W. H, SCHMIDT, T. M. E NEALSON K.H., (1988) Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. Appl. Environ. Microbiol. 54(6):1602–5
- ROSNER, M.B., ENSIGN C.J. e SCHINK B., (1996) Anaerobic Metabolism of Primary and Secondary Forms of *Photorhabditis luminescens*. FEMS Microbiology 140:227-232.
- SCHMIDT, J., e J. N. All., (1979) Attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to common excretory products of insects. Environ. Entomol. 8: 55-61.
- SHAPIRO, D.I., GLAZER, I. (1996) Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. Environ. Entomol.
- SHAPIRO, D.I., LEWIS, E.E. (1999) Comparisons of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. Environ. Entomol. 28:907-911.

- SHAPIRO-ILAN, D.I., GOUGE D.H., PIGGOTT S.J., FIFE J.P., (2006) Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol. Control* 38: 124–133.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., NYCZEPIR, A.P., LEWIS, E.E. (2006) Entomopathogenic nematodes and bacteria applications for control of the pecan root-knot nematode, *Meloidogyne partityla*, in the greenhouse. *Journal of Nematology*. ;38:449-454.
- SHARMA, S., WATERFIELD, N., BOWEN, D., ROCHELEAU, T., HOLLAND, L., FFRENCH-CONSTANT, R., (2002). The lumicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214(2):241–49.
- SICARD, M., FERDY, J.B., PAGÈS, S., LE BRUN N., GODELLE, B., BOEMARE, N., MOULIA, C., (2004) When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *J Evol Biol* , 17(5):985-993.
- SICARD, M., HERING, S., SCHULTE, R, GAUDRIALT, S., SCHULENBURG, H., (2007) The effect of *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) on the survival, development, reproduction and behaviour of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae). *Environ. Microbiol.* 9(1):12–25.
- SMIGIELSKI, A. J., AKHURST, R. J., e BOEMAR E, N. E., (1994) Phase Variation in *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*: Differences in Respiratory Activity and Membrane Energization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 120-125.
- SOMASEKHAR, N., GREWAL, P.S., De NARDO E, A.B., STINNER B.R. (2002) Non-target effects of entomopathogenic nematodes on the soil nematode community. *Journal of Applied Ecology*, 39: 735-744.
- SOUZA, R. M., NOGUEIRA, S.M., LIMA, I.M., MELARATO, M. e DOLINSKI C. (2006) Manejo do nematoide das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. *Nematologia Brasileira*, v. 30, n. 2, p. 165-169.
- STARR, J. L. (1993) Recovery and longevity of egg masses of *Meloidogyne incognita* during simulated winter survival. *Jornal of Nematology* 25, 244-248.

- TAYLOR, A. L. e SASSER, J. N. (1978). *Biology, identification and control of root-knot nematodes* Raleigh; N. C. State Univ., 111 p.
- WALLACE, H.R., (1971) The influence of temperature on embryonic development and hatch of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, Leiden, v. 171, p. 170-186.
- WALLACE, H. R., (1968). The influence of soil moisture on survival and hatch of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 14:231-242.
- WATERFIELD, N. R. TODD C. and CLARKE D., (2009) *Photorhabdus* and a Host of Hosts. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:557–74.
- WATERFIELD, N., HARES, M., YANG, G., DOWLING, A., (2005) French-Constant R.. Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cell Microbiol.* 7(3):373–82.
- WRIGHT, D.J. and PERRY, R.N. (2006) Reproduction, physiology and biochemistry. In.: Perry, R. N.,and Moens, M. (eds) *Plant Nematology*. CAB International Wallingford UK, pp. 187-209.