

ALIXELHE PACHECO DAMASCENA

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE NEMATOIDE-
DAS-GALHAS *Meloidogyne enterolobii***

Botucatu

2019

ALIXELHE PACHECO DAMASCENA

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE NEMATOIDE-DAS-
GALHAS *Meloidogyne enterolobii***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientadora: Prof^a. Dra. Sílvia Renata Siciliano Wilcken

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

D155n	Damascena, Aixelhe Pacheco, 1995- Nematoides entomopatogênicos para o controle de nematoide-das-galhas <i>Meloidogyne enterolobii</i> / Aixelhe Pacheco Damascena. - Botucatu: [s.n.], 2019 57 p.: grafs., tabs. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2019 Orientadora: Sílvia Renata Siciliano Wilcken Inclui bibliografia 1. Pragas agrícolas - Controle biológico. 2. Nematoda. 3. Nematoides entomopatogênicos. 4. Mortalidade. 5. Ovos - Eclodibilidade. I. Wilcken, Sílvia Renata Siciliano. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.
-------	---

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

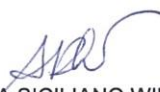
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "NEMATOIDE ENTOMOPATOGENICO PARA O CONTROLE DE
NEMATOIDE-DAS-GALHAS *Meloidogine enterolobii*"

AUTORA: ALIXELHE PACHECO DAMASCENA

ORIENTADORA: SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof.ª Dr.ª SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP



Pesquisadora Dr.ª MARIA JOSÉ DE MARCHI GARCIA
Descentralização e Desenvolvimento / APTA - Polo Regional Centro Oeste - Bauru



Pesquisador Dr. LUIS GARRIGÓS LEITE
Fitossanidade / Instituto Biológico de São Paulo / São Paulo/SP

Botucatu, 28 de fevereiro de 2019.

Ofereço

A Deus por ser a minha fonte de força, fé e perseverança.

Dedico

Aos meus amados pais Jany Maria Pacheco Damascena e Alecir de Oliveira Damascena por serem os meus maiores incentivadores da vida e pelo amor incondicional.

Ao meu querido irmão Alexandre Damascena Neto por sempre acreditar em mim e me ajudar nos momentos em que eu precisei.

Ao meu sobrinho Arthur Vidal Damascena que foi o maior presente de Deus em nossas vidas.

Aos meus avós que sofreram tanto pela distância, mas que sempre vibraram em cada vitória.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram sempre ao meu lado.

Amo Vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter me sustentado até aqui, guiado todos meus passos, me dando sabedoria, consolo e conforto em todos os momentos.

A Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelo suporte para realização do trabalho e pela oportunidade de estudo.

A Prof^a. Dra. Sílvia Renata Siciliano Wilcken, pela orientação, pela oportunidade de trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade, pelas conversas, pelos conselhos e pela confiança.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus pais, Jany e Alecir, por todo o amor dedicado, por sempre estarem ao meu lado, por acreditarem em mim e por terem e por serem meu porto seguro.

Ao meu irmão Alexandre, pelo apoio, incentivo e por acreditar em meu potencial.

A minha família pelo apoio, orações, incentivo e por todo carinho.

Aos amigos e colegas, pelo companheirismo, amizade, e pela torcida.

Aos meus amigos Júlio e Marylia, pelo auxílio em todos os experimentos, pela companhia, pelos conhecimentos compartilhados, pelas risadas, pelas avaliações divertidas e por terem tornado todo o trabalho prazeroso.

Aos meus amigos do laboratório de Nematologia da FCA/Unesp, Marylia, Júlio, Cintia, Luana, Vanessa Gomes, Vanessa Rafaela, Beatriz, Vinícius, Breno e Gustavo por todo carinho, amizade e companheirismo ao longo deste tempo.

Aos meus amigos de Alegre-ES, que mesmo diante dos 1100 km que nos separavam fisicamente sempre estiveram torcendo e acreditando em meu potencial.

Aos novos amigos de Botucatu-SP, agradeço pelo companheirismo ao longo desses anos e por serem minha família nesta cidade, principalmente a Sabrina Ongaratto, minha companheira fiel ao longo desse tempo e que me ajudou nos momentos difíceis.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Proteção de Plantas pelos ensinamentos transmitidos.

A banca examinadora por ter aceito o convite.

Ao Laboratório de Nematologia da FCA-Unesp pela oportunidade de realização dos experimentos e utilização das dependências e materiais.

A todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação, meu muito obrigada.

O coração do homem traça o seu caminho, mas o SENHOR lhe dirige os passos.

Provérbios 16:9

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós”.

Chico Xavier

RESUMO

Nos últimos anos, tem-se estudado o uso de nematóides entomopatogênicos (NEPs) como estratégia de controle de nematoides parasitas de plantas. No entanto, são necessários estudos que comprovem em quais fases do desenvolvimento dos nematoides fitoparasitas ocorre o efeito dos NEPs e os mecanismos envolvidos. Para verificar a influência *Steinernema brazilense* IBCB 06, *S. feltiae* (Filipjev) IBCB 47, *S. rarum* (Doucet) IB (Rhabditida: Steinernematidae), *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e *H. bacteriophora* (Poinar) IB (Rhabditida: Heterorhabditidae) na eclosão do fitonematoide *M. enterolobii*, 500 ovos e 1.000 juvenis infectantes de cada espécie de nematoide entomopatogênico foram colocados em um recipiente de plástico totalizando 25 mL de suspensão e mantidos em câmara incubadora a 25°C. O número de juvenis eclodido na suspensão foi contado a cada dois dias totalizando 10 dias. Para contagem, foi retirado um mL de suspensão e o nematoide contado na câmara de Peters sob microscópio de luz. Para avaliar o efeito dos NEPs sobre a mortalidade de juvenis infectantes de *M. enterolobii*, 500 juvenis infectantes de e 1.000 juvenis de cada espécie de nematoide entomopatogênico foram colocados em um recipiente de plástico totalizando 25 mL de suspensão. A mortalidade foi avaliada a cada dois dias por um tempo de 10 dias. A avaliação da mortalidade de *M. enterolobii* foi realizada pela contagem dos nematoides móveis e imóveis adicionando-se duas gotas de NaOH 1N à suspensão de nematoides. A contagem foi feita logo a seguir, considerando-se mortos os nematoides retos e imóveis, e, vivos, os retorcidos. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizados, em esquema de parcelas subdivididas no tempo, com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade no programa R Development Core Team. Para avaliar o efeito dos NEPs sobre a infecção por *M. enterolobii*, mudas de tomateiro foram inoculadas com 500 ovos e juvenis infectantes de *M. enterolobii* e 0 (somente água), 100, 500, 1.000 e 5.000 juvenis de NEPs por vaso. Sessenta dias após a inoculação, o sistema radicular de cada planta foi lavado em água corrente e submetido à coloração com Floxina B para a obtenção dos índices de galhas (IG) e índices de massas de ovos (IMO). Além disso, o sistema radicular foi pesado e cortado em pedaços pequenos para extração dos ovos. O número total de ovos e juvenis de *M. enterolobii* por sistema radicular foi

quantificado com o auxílio de um microscópio de luz e lâminas de Peters e posteriormente calculado o fator de reprodução. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizados, em esquema de fatorial duplo, com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no programa R Development Core Team. Os resultados demonstraram que a utilização dos nematoides entomopatogênicos testados *S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* afetam a eclosão de *M. enterolobii*, proporcionando menor número de juvenis eclodidos. De forma geral os NEPs *S. brazilense* e *S. rarum* proporcionaram mortalidade no segundo dia após a instalação do experimento e *H. bacteriophora* afetou a mortalidade dos juvenis no 4º dia. Nas demais avaliações, não houve diferença estatística. Além disso, todos os NEPs proporcionaram redução do número de galhas, massa de ovos, número total de nematoides e fator de reprodução na concentração de 5.000 juvenis por vaso. Entretanto, *S. feltiae* em baixas concentrações (100 juvenis por vaso) se destaca por proporcionar redução nos mesmos parâmetros metodológicos avaliados. Os resultados obtidos demonstram o potencial da utilização de NEPs em programas de manejo integrado de *M. enterolobii*.

Palavras-chave: Eclosão. Mortalidade. Infecção. Controle Biológico.

ABSTRACT

In recent years, the use of entomopathogenic nematodes (EPNs) has been studied as a strategy to control plant parasitic nematodes. However, studies are needed to prove in which phases of development of plant-parasitic-nematodes occurs the effect of EPNs and the mechanisms involved. To verify the influence of *Steinernema brazilense* IBCB 06, *S. feltiae* (Filipjev) IBCB 47, *S. rarum* (Doucet) IB (Rhabditida: Steinernematidae), *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e *H. bacteriophora* (Poinar) IB (Rhabditida: Heterorhabditidae) in the hatching of *M. enterolobii*, 500 eggs and 1.000 infective juveniles of each entomopathogenic nematode species were placed in a plastic container totaling 25 ml of suspension and kept in an incubator chamber at 25 °C. The number of juveniles hatched in the suspension was counted every two days totaling 10 days. For counting, one mL of suspension was withdrawn and the nematode counted in a Peters's chamber under light microscope. To evaluate the effect of EPNs on the mortality of *M. enterolobii* infective juveniles, 500 juvenile infective of 1000 juveniles of each entomopathogenic nematode species were placed in a plastic container totaling 25 mL of suspension. Mortality was assessed every two days for a time of 10 days. The evaluation of *M. enterolobii* mortality was performed by counting the mobile and immobile nematodes by adding two drops of 1N NaOH to the nematode suspension followed by counting, considering the dead straight and immobile nematodes, and, alive, the twisted ones. The experiments were conducted in a completely randomized experimental design, in a subdivided plots scheme with six replications. The data were submitted to analysis of variance, comparing the means by the Scott-Knott test to 5% probability in the R Development Core Team program. To evaluate the effect of EPNs on *M. enterolobii* infection, tomato seedlings were inoculated with 500 eggs and infective juveniles of *M. enterolobii* and 0 (water only), 100, 500, 1,000 and 5,000 juveniles of EPNs per pot. Sixty days after inoculation, the root system of each plant was washed in running water and subjected to floxin B staining to obtain gall indexes (GI) and egg mass indexes (IMO). In addition, the root system was weighed and cut into small pieces for egg extraction. The total number of eggs and juveniles of *M. enterolobii* by root system was quantified with the aid of a light microscope and Peters' slides and then the reproduction factor was calculated. The experiments were conducted in a completely

randomized experimental design with a double factorial scheme with six replications. The data were submitted to analysis of variance, comparing the means by the Tukey test at 5% probability in the R Development Core Team program. The results showed that the use of the entomopathogenic nematodes tested *S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* and *H. bacteriophora* affect the hatching of *M. enterolobii*, providing a smaller number of juvenile hatchlings. In general, EPNs *S. brazilense* and *S. rarum* provided mortality on the second day after the experiment, and *H. bacteriophora* affected juvenile mortality on the 4th day. In the other evaluations, there was no statistical difference. In addition, all EPNs reduced the number of galls, egg mass, total number of nematodes and reproduction factor at the concentration of 5.000 juveniles per pot. However, *S. feltiae* at low concentrations (100 juveniles per vessel) is notable for providing reduction in the same methodological parameters evaluated. The results demonstrate the potential of the use of EPNs in integrated management programs of *M. enterolobii*.

Keywords: Hatching. Mortality. Infection. Biological control.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Índice de massa de ovos (IMO) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação com diferentes (A) espécies de Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) e (B) diferentes concentrações de NEPs (Experimento 1).....	45
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Eclosão de <i>Meloidogyne enterolobii</i> sob a interferência de nematoides entomopatogênicos	32
Tabela 2 – Índice de massas de ovos (IMO), Índice de galhas (IG), número total de nematoides (NT) e fator de reprodução (FR) e reação (R) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> em raízes de tomate 'Rutgers' sob a interferência de nematoides entomopatogênicos	33
Tabela 3 – Mortalidade de <i>M. enterolobii</i> sob a interferência de nematoides entomopatogênicos	34

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Índice de galhas (IG) em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação de <i>Meloidogyne enterolobii</i> e diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos (NEPs)	44
Tabela 2 – Índice de massa de ovos (IMO) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação com diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos (NEPs) (Experimento 2)	46
Tabela 3 – Número total (NT) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação com diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos (NEPs)	47
Tabela 4 – Fator de reprodução (FR) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação com diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos (NEPs)	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NEPs	Nematoides entomopatogênicos
NPP	Nematoides parasitas de plantas
JI	Juvenil infectante

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	23
CAPÍTULO 1 - ECLOSÃO E MORTALIDADE DE <i>Meloidogyne enterolobii</i> SOB	
A INTERFERÊNCIA DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS IN VITRO ...	26
1.1 INTRODUÇÃO	28
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1.3 RESULTADOS.....	31
1.4 DISCUSSÃO	34
1.5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 2 – SUPRESSÃO DE <i>Meloidogyne enterolobii</i> POR NEMATOIDES	
ENTOMOPATOGÊNICOS.....	39
1.1 INTRODUÇÃO	41
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
1.3 RESULTADOS.....	44
1.4 DISCUSSÃO	48
1.5 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertencente à família Solanaceae, é constituída por cerca de 90 gêneros (CATTELAN, 2008). O gênero *Solanum* é o quinto maior gênero dentre as angiospermas (Magnoliophyta), abrangendo 3.000 espécies, podendo ser encontrado em todas as regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e Austrália, com menor número de espécies euroasiáticas (MIZ, 2006).

O tomate é classificado como uma das mais importantes hortaliças, no aspecto produtivo, econômico e social, tendo como mercado principal dois segmentos, de mesa e processamento (NASCIMENTO, 2011). Sua riqueza nutricional, especialmente quanto à presença de vitaminas, além do sabor e cor agradável, contribuíram para a rápida popularização e consumo no mundo. O teor de vitaminas presente no tomate depende da nutrição, variedade e condições de cultivo. O fruto fresco é rico em vitamina C e seu conteúdo calórico é baixo, é fonte de vitamina A e ferro, pela escassez em massa seca e gordura (ESPINOZA, 1991).

Existem diversos patógenos associados ao tomateiro, dentre estes, os nematoides parasitas de plantas constituem um fator limitante para o cultivo bem sucedido desta olerícola (SILVA et al., 2014). Os nematoides parasitas de plantas (NPP) são organismos com elevada especialidade que habitam preferencialmente na rizosfera das plantas. Possuem diversas estratégias para infectar órgãos da planta hospedeira e conseguem suprimir as defesas das plantas devido a alimentação e infecção no sistema radicular, dificultando adoção de medidas efetivas de controle (KERRY, 2000; JASMER et al., 2003; WUYTS et al., 2007; MACHADO et al., 2012; HAEGEMAN et al., 2012).

Expressivas perdas econômicas causadas por nematoides fitoparasitas são relatadas anualmente na agricultura mundial (SINGH et al., 2013). Entre os grupos mais estudados estão os endoparasitas sedentários, *Meloidogyne* spp. (LEAL-BERTIOLI et al., 2016), *Rotylenchulus reniformis* (GANJI et al., 2013; ROBINSON et al., 1997) e *Heterodera* sp. (GANJI et al., 2013) e endoparasitas migradores, *Pratylenchus* spp. (VIEIRA et al., 2015; JONES; FOSU-NYARKO, 2014). O ataque de nematoides tem sido relatado em muitas espécies de plantas cultivadas (MACHADO et al., 2012; DIAS et al., 2010; CHIAMOLERA et al., 2012; GARDIANO et al., 2012), sendo o nematoide-das-galhas (*Meloidogyne*) o gênero mais comum em áreas

cultivadas com tomate (*Solanum lycopersicum*) resultando em perdas de 30 a 80% na produção (CHARCHAR, 1995).

O manejo dos nematoides das galhas é difícil de ser conduzido e em áreas de cultivo de olerícolas torna-se ainda mais problemático, em decorrência da sucessão de culturas hospedeiras (ROSA et al., 2015; KORAYEM et al., 2015). Portanto, o controle desses nematoides é vital para a agricultura (AKHTAR; MALIK, 2000). Sendo assim, métodos alternativos e eficientes para controle de nematoides devem ser estudados. O controle biológico torna-se uma opção sustentável, com resultados satisfatórios no manejo de nematoides parasitas de plantas (COIMBRA; CAMPOS, 2005; ARAUJO; MARCHESI, 2009).

Relatos de aplicações de nematoides entomopatogênicos (NEPs) suprimindo algumas espécies de nematoides parasitas de plantas em experimentos realizados em casa de vegetação (BIRD; BIRD, 1986; ISHIBASHI; KONDO, 1986; ISHIBASHI; CHOI, 1991; GOUGE et al., 1994) e em experimentos realizados no campo (GREWAL et al., 1997), despertaram interesse na utilização de NEPs no controle de NPP. Esses efeitos foram atribuídos devido a aglomeração dos NEPs próximo as raízes da planta hospedeira (BIRD; BIRD, 1986; ISHIBASHI; CHOI, 1991) e a liberação de metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias simbióticas dos NEPs (HU et al., 1995; GREWAL et al., 1999).

NEPs dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* e suas respectivas bactérias associadas, *Xenorhabdus* spp., e *Photorhabdus* spp., estão comercialmente disponíveis nos Estados Unidos e Europa para controlar insetos pragas do solo (GE GAUGLER et al., 2000). O juvenil infectante de terceiro estágio (JI) é de vida livre, que procura e infecta um inseto. Após a infecção, a bactéria associada aos NEPs é liberada na hemocel do hospedeiro, se multiplicando rapidamente, fornecendo alimento e condições ideais para o desenvolvimento dos NEPs. Toxinas liberadas pelas bactérias, matam o inseto hospedeiro dentro de 48 a 72h após a infecção (BURMAN, 1982; AKHURST; BOEMARE, 1990).

Além disso, os NEPs também podem suprimir a população de algumas espécies de nematoides parasitas de plantas (BIRD; BIRD, 1986; ISHIBASHI; KONDO, 1986; LEWIS; GREWAL, 2005). Efeitos supressivos dos NEPs a nematoides parasitas de plantas (NPP) foram observados em *Belonolaimus longicaudatus*, *Criconemoides* spp. (GREWAL et al., 1997), *Globodera rostochiensis* (PERRY et al., 1998), e *Meloidogyne* spp. (LEWIS; GREWAL, 2005).

Diante da importância desse patógeno na agricultura mundial, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a eclosão, mortalidade e supressão da população de *Meloidogyne enterolobii* em tomate cv. 'Rutgers' utilizando NEPs das espécies *Steinernema brazilense* PONTO2C, *S. feltiae* (Filipjev) IBCB47, *S. rarum* (Doucet) PAM25 (Rhabditida: Steinernematidae), *Heterorhabditis amazonensis* IBCB10 e *H. bacteriophora* (Poinar) HB (Rhabditida: Heterorhabditidae).

Para isso, a dissertação será apresentada em dois capítulos. O capítulo 1 “Eclosão e mortalidade de *Meloidogyne enterolobii* (YANG; EISENBACK, 1983) sob a interferência de nematoides entomopatogênicos *in vitro*” conforme normas da Revista Journal of Nematology, em que se objetivou analisar a interferência dos NEPs na eclosão e na mortalidade de *M. enterolobii*. O capítulo 2, “Supressão de *Meloidogyne enterolobii* por nematoides entomopatogênicos” foi redigido de acordo com as normas da Revista Biological Control, cujo objetivo foi de avaliar a supressão de diferentes espécies de NEPs a *M. enterolobii* apresentando-se como uma alternativa de manejo desse patógeno.

CAPÍTULO 1

Eclosão e mortalidade de *Meloidogyne enterolobii* sob a interferência de nematoides entomopatogênicos *in vitro*

(Artigo redigido conforme normas da Revista Journal of Nematology)

Resumo

Nematoides parasitas de plantas tem se tornado um dos principais problemas no cultivo de olerícolas. Dentre estes, *Meloidogyne enterolobii* apresenta grandes desafios ao produtor, pois é uma espécie polífaga, de difícil controle, e apresenta alto grau de disseminação e multiplicação, alcançando altos níveis populacionais em curto período de tempo. Dentre os métodos que são estudados para controle dos fitonematoides, os nematoides entomopatogênicos (NEPs) se apresentam como potencial para controle biológico deste patógeno por apresentarem capacidade de aglomeração próximo as raízes das plantas e de liberar metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias simbióticas dos NEPs. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar a interferência dos NEPs *S. braziliense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* na eclosão e mortalidade de *M. enterolobii*. 500 ovos deste nematoide e 1.000 juvenis infectantes de cada espécie de nematoide entomopatogênico foram colocados em recipiente de plástico totalizando 25 mL de suspensão e mantidos em câmara incubadora a 25°C. O número de juvenis eclodido na suspensão foi contado a cada dois dias totalizando 10 dias. Para contagem, foi retirado um mL de suspensão e o nematoide contado na câmara de Peters sob microscópio de luz. No experimento de mortalidade, 500 juvenis infectantes de *M. enterolobii* e 1.000 juvenis de cada espécie de nematoide entomopatogênico foram colocados em pote plástico totalizando 25 mL de suspensão. A mortalidade foi avaliada a cada dois dias por um tempo de 10 dias. A avaliação da mortalidade dos juvenis foi realizada pela contagem dos nematoides móveis e imóveis adicionando-se duas gotas de NaOH 1N à suspensão de nematoides. A contagem foi feita logo a seguir, considerando-se mortos os nematoides retos e imóveis, e, vivos, os retorcidos. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizados, em esquema de parcelas subdivididas no tempo, com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa R Development Core Team. Verificou-se que no 10º dia todos os nematoides entomopatogênicos proporcionaram redução na eclosão de *M. enterolobii*. Porém, no teste de mortalidade, os NEPs *S. braziliense* e *S. rarum* proporcionaram mortalidade no segundo dia e *H. bacteriophora* afetou a mortalidade dos juvenis no 4º dia. Nas demais avaliações, não houve diferença estatística.

Palavras-chaves: Nematoides fitoparasitas. Manejo. Controle Biológico. Entomopatógenos.

Hatching and mortality of *Meloidogyne enterolobii* under the interference of entomopathogenic nematodes in vitro

Abstract

Plant parasitic nematodes have become one of the main problems in the cultivation of vegetable plants. Among these, *Meloidogyne enterolobii* presents great challenges to the produtor, since it is a polyphagous species, difficult to control, and presents a high degree of dissemination and multiplication, reaching high population levels in a short period of time. Among the methods that are studied for phytonuthoid control, entomopathogenic nematodes (EPNs) present as potential for biological control of this pathogen because they have agglomeration capacity near the roots of the plants and to release allelochemicals produced by the symbiotic bacteria of the EPNs. Therefore, the objective of the study was to evaluate the interference of EPNs *S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* and *H. bacteriophora* on hatching and mortality of *M. enterolobii*. 500 eggs of this nematode and 1.000 infective juveniles of each entomopathogenic nematode species were placed in a plastic container totaling 25 mL of suspension and kept in an incubator at 25 °C. The number of juveniles hatched in the suspension was counted every two days totaling 10 days. For counting, one ml of suspension was withdrawn and the nematode counted in the Peters's chamber under light microscope. In the mortality experiment, 500 infective juveniles of *M. enterolobii* and 1.000 juveniles of each entomopathogenic nematode species were placed in a plastic pot totaling 25 mL of suspension. Mortality was assessed every two days for a time of 10 days. The evaluation of juvenile mortality was performed by counting the mobile and imotile nematodes by adding two drops of 1N NaOH to the nematode suspension. The counting was done soon after, considering the dead straight and immobile nematodes, and, alive, the twisted ones. The experiments were conducted in a completely randomized experimental design, in a subdivided plots scheme with six replications. The data were submitted to analysis of variance, comparing the means by the Scott-Knott test at 5% probability. The analyzes were carried out in the R Development Core Team program. It was verified that on the 10th day all entomopathogenic nematodes gave reduction in the hatching of *M. enterolobii*. However, in the mortality test, EPNs *S. brazilense* and *S. rarum* provided mortality on the second day and *H. bacteriophora* affected juvenile mortality on the 4th day. In the other evaluations, there was no statistical difference.

Key words: Phytopathogenic nematodes. Management. Biological control. Entomopathogens.

1.1 Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das olerícolas mais cultivadas no Brasil, com área total de 54.051 ha e produção de 3.472.55 toneladas, sendo os estados de São Paulo e Goiás os maiores produtores (IBGE, 2016). Diante da importância sócioeconômica da cultura e da necessidade de condições ambientais controladas para o cultivo, fizeram com que o tomateiro passasse a ser cultivado em ambiente protegido, possibilitando o aumento da produção. Entretanto, favoreceu o desenvolvimento de diversos problemas fitossanitários, dentre eles, os nematoides fitoparasitas (Rosa et al., 2015).

Os nematoides parasitas de plantas tem se tornado um dos principais problemas no cultivo de olerícolas em geral. Dentre estes, o gênero *Meloidogyne* spp. representa o grupo de maior importância, pois são encontradas espécies que causam elevados danos à produção agrícola em nível mundial (Silva et al., 2014). As espécies deste gênero podem acarretar 100% de perdas na produção e por isso são consideradas uma das mais danosas no cultivo de olerícolas (Kurozawa e Pavan, 2005; Perry e Moens, 2006).

Meloidogyne enterolobii tem se mostrado um grande desafio aos produtores (Yang e Eisenback, 1983), por ser considerada polífaga, e por apresentar alto grau de disseminação e multiplicação (Carneiro et al., 2006). A espécie *M. enterolobii* foi descrita a partir do parasitismo em raízes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.), na China. *M. enterolobii* possui ampla gama de hospedeiros, alta taxa de reprodução, elevada agressividade e capacidade de superar fontes de resistência existentes a outras espécies de *Meloidogyne* (Brito et al., 2007; Cantu et al., 2009).

Diversos métodos são estudados para controle dos fitonematoides. Dentre estes, os nematoides entomopatogênicos apresentam-se como potencial para controle biológico destes parasitas por apresentarem capacidade de aglomeração próximo as raízes das plantas e de liberar metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias simbióticas dos NEPs (Hu et al., 1995; Grewal et al., 1999).

Diante do exposto, os objetivos do presente estudo foram avaliar a eclosão e mortalidade de *M. enterolobii* na presença de *Steinernema brazilense* PONTO2C, *S. feltiae* (Filipjev) IBCB47, *S. rarum* (Doucet) PAM25 (Rhabditida: Steinernematidae),

Heterorhabditis amazonensis IBCB10 e *H. bacteriophora* (Poinar) HB (Rhabditida: Heterorhabditidae) *in vitro*.

1.2 Material e Métodos

Interferência de NEPs na eclosão de *M. enterolobii*

Os experimentos foram desenvolvidos em câmaras incubadoras (B.O.D) do laboratório de Nematologia Agrícola do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP.

A população pura de *M. enterolobii* utilizada nos experimentos foi obtida de plantas de tomateiros mantidas em casa de vegetação como fonte de inóculo e multiplicada em tomate 'Rutgers' em potes de 1.000 cm³ contendo substrato composto de solo, areia e matéria orgânica na proporção de 1: 1: 1 (v: v: v), previamente esterilizado em autoclave (120 °C por 2 h). Os ovos do nematoide foram extraídos de raízes de tomate pelo método de Hussey e Barker (1973) e a concentração da suspensão determinada com o auxílio da câmara de Peters sob um microscópio de luz.

As populações de NEPs foram obtidas da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos do Banco do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil. Os juvenis infectantes (JIs) de *S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* foram multiplicados em larvas de terceiro a quinto instar de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). Foram utilizadas cinco larvas por placa de Petri (9 cm de diâmetro) revestidas com papel de filtro umedecido com uma suspensão de nematoides à concentração de 500 JIs / cm². As larvas mortas de *D. saccharalis* foram transferidas para armadilhas de White (White, 1927) e armazenadas em câmara incubadora (BOD) a 25 °C. Os JIs foram coletados em um filme de água (1 cm de profundidade) em Erlemeyers, que foram mantidos em câmara de BOD a temperatura de 18 ° C, 70% de HR e usado até 48h após a coleta.

No experimento, 500 ovos de *M. enterolobii* e 1.000 JI de cada espécie de nematoide entomopatogênico foram colocados em recipiente de plástico (50 mL) dispersos em 25 mL de suspensão e mantidos em câmara incubadora (BOD) a 25°C. O número de J2 eclodido na suspensão foi contado a cada dois dias totalizando 10 dias. Para contagem, foi retirado um mL de suspensão e os nematoides contados em

câmara de Peters sob microscópio de luz. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos (T1=*M. enterolobii*; T2=*M. enterolobii* + *S.brazilense*; T3=*M. enterolobii* + *S. rorum*; T4=*M. enterolobii* + *S. feltiae*; T5=*M. enterolobii* + *H. amazonensis*; T6=*M. enterolobii* + *H.bacteriophora*) e 6 repetições.

Após os 10 dias de avaliações, a suspensão restante (15 mL) contendo *M. enterolobii* e NEPs, foi inoculada em mudas de tomate 'Rutgers', previamente transplantadas em potes de 1.000 cm³ contendo substrato composto de solo, areia e matéria orgânica na proporção de 1: 1: 1 (v: v: v), esterilizado em autoclave (120 °C por 2 h). A suspensão foi contada em lcontinha aproximadamente 300 ovos e eventuais juvenis de *M. enterolobii* e 600 JI de cada espécie de nematoide.

Sessenta dias após a inoculação, o sistema radicular de cada planta foi lavado em água corrente e submetido à coloração com Floxina B para a obtenção dos índices de galhas (IG) e índices de massas de ovos (IMO) de acordo com a escala de notas proposta por Taylor e Sasser (1978), em que: nota 0 = sem galhas ou massas de ovos; nota 1 = 1 a 2 galhas ou massas de ovos; nota 2 = 3 a 10 galhas ou massas de ovos; nota 3 = 11 a 30 galhas ou massas de ovos; nota 4 = 31 a 100 galhas ou massas de ovos e nota 5 = mais de 100 galhas ou massas de ovos por raiz.

Para a extração dos ovos, o sistema radicular foi cortado em pedaços pequenos (aproximadamente 1 cm de comprimento) processados pelo método descrito por Hussey e Barker (1973) em que o sistema radicular é triturado em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio, seguida de peneiramento. O número total de ovos e juvenis de *M. enterolobii* por sistema radicular foi quantificado com o auxílio de um microscópio de luz e de lâminas de Peters. O fator de reprodução foi calculado através da fórmula $FR = PF / PI$, onde PF = população final do nematoide e PI= população inicial do nematoide (PI= 300 ovos). Para maior confiabilidade dos dados, os experimentos foram conduzidos duas vezes.

Interferência de NEPs na mortalidade de J2 de *M. enterolobii*

O experimento foi desenvolvido em câmara incubadora (B.O.D) do laboratório de Nematologia Agrícola do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",

Botucatu-SP. A população pura de *M. enterolobii* e a população de NEPs para realização dos experimentos, foram obtidas como descrito no experimento anterior.

Para obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) a serem utilizados nos experimentos, a suspensão contendo ovos de *M. enterolobii* foi colocada em aparatos de Baermanns modificados para recipientes rasos conforme Southey (1986). As coletas de J2 foram realizadas a cada 24h. Sendo assim, 500 J2 de *M. enterolobii* e 1.000 J1 de cada espécie de nematoide entomopatogênico foram colocados em potes de plástico totalizando 25 mL de suspensão. A mortalidade foi avaliada a cada dois dias por 10 dias. A avaliação da mortalidade de *M. enterolobii* foi realizada pela contagem dos nematoides móveis e imóveis conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000), que consiste em adicionar duas gotas de NaOH 1N à suspensão de nematoides. A contagem foi feita logo a seguir, considerando-se mortos os nematoides retos e imóveis, e, vivos, os retorcidos. Para maior confiabilidade dos dados, os experimentos foram conduzidos duas vezes.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizados, em esquema de parcelas subdivididas no tempo, com seis repetições. O fator com os tratamentos foi avaliado nas parcelas; e os dias nas subparcelas. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa R Development Core Team (2009).

1.3 Resultados

Interferência de NEPs na eclosão de *M. enterolobii*

A utilização de nematoides entomopatogênicos afetou a eclosão de *M. enterolobi*. Nas primeiras avaliações (2º e 4º dia) não houve diferença estatística entre os tratamentos ($P>0,05$). Entretanto, no 6º dia, todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha, proporcionando redução na eclosão de *M. enterolobii*. No 8º dia, somente o tratamento composto por *S. rarum* (SR) e *H. bacteriophora* (HA) proporcionaram redução na eclosão. Na última avaliação (10º dia), todos os nematoides entomopatogênicos proporcionaram redução na eclosão de *M. enterolobii* ($P<0,05$) (Tabela 1). O número máximo de *M. enterolobii* eclodido na testemunha e nos tratamentos compostos por *S. rarum* (SR), *S. feltiae* (SF) e *H. bacteriophora* (HB) foi no 10º dia. Já para os tratamentos *S. braziliense* (SB) e *H.*

amazonensis (HA) a eclosão máxima ocorreu no 8º dia, não diferindo-se estatisticamente do 10º dia.

Tabela 1 Eclosão de *Meloidogyne enterolobii* sob a interferência de nematoides entomopatogênicos.

Experimento 1														
Trat	2º dia			4º dia			6º dia			8º dia		10º dia		
Test	54,2 ± 18,8	aA		72,8 ± 33,9	aA		164,5 ± 83,4	aB		155,2 ± 53,0	aB		374,0 ± 76,8	aC
SB	16,7 ± 6,9	aA		72,8 ± 30,6	aA		70,0 ± 41,3	bA		215,3 ± 84,7	aB		204,0 ± 56,9	cB
SR	29,2 ± 10,2	aA		69,0 ± 20,6	aA		122,5 ± 67,0	bB		72,8 ± 51,6	bA		265,5 ± 51,3	bC
SF	12,5 ± 5,9	aA		38,3 ± 11,9	aA		59,5 ± 27,9	bA		164,7 ± 49,0	aB		289,0 ± 88,0	bC
HA	20,8 ± 18,8	aA		65,1 ± 30,6	aA		122,5 ± 42,9	bB		202,7 ± 39,2	aC		206,8 ± 68,3	cC
HB	8,3 ± 4,9	aA		103,5 ± 40,5	aB		136,5 ± 51,0	bC		79,2 ± 36,9	bB		206,3 ± 50,9	cD

Experimento 2														
Trat	2º dia			4º dia			6º dia			8º dia			10º dia	
Test	45,8 ± 29,2	aA		76,7 ± 64,5	aA		178,5 ± 57,1	aB		133,0 ± 52,4	aB		317,3 ± 91,7	aC
SB	20,8 ± 14,6	aA		72,8 ± 33,9	aA		70,0 ± 45,3	bA		253,3 ± 71,1	aB		266,3 ± 68,6	bB
SR	50,0 ± 24,7	aA		72,8 ± 33,9	aA		110,5 ± 75,6	bB		91,8 ± 20,0	bA		268,3 ± 114,6	bC
SF	16,7 ± 10,4	aA		92,0 ± 43,6	aA		70,0 ± 34,3	bA		104,5 ± 50,1	aB		223,8 ± 66,6	bC
HA	8,8 ± 4,9	aA		65,2 ± 39,6	aA		111,0 ± 25,4	bB		202,7 ± 31,0	aC		240,8 ± 99,4	bC
HB	16,7 ± 10,4	aA		84,3 ± 37,6	aB		80,5 ± 15,8	bB		116,5 ± 37,5	bC		232,3 ± 96,6	bC

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Test= Testemunha; SB=*Steinernema brazilense*; SF=*S. feltiae*; SR=*S. rorum*; HA=*Heterorhabditis amazonensis*; HB= *H. bacteriophora*.

Após 10 dias de avaliação do experimento a suspensão restante foi inoculada em plantas de tomateiro. Foi possível verificar que o índice de galha (IG), índice de massa de ovos, número de nematoides totais (NT) e o fator de reprodução (FR) foram reduzidos significativamente nos tratamentos com todas as espécies de nematoides entomopatogênicos testadas ($P < 0,05$). Verifica-se que em todos os tratamentos houve penetração de *M. enterolobii*, porém o fator de reprodução nos tratamentos com NEPs foram reduzidos consideravelmente. A viabilidade do inóculo foi confirmada nos dois experimentos, com $FR = 2,6$ e $5,7$ respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 Índice de massas de ovos (IMO), Índice de galhas (IG), número total de nematoides (NT) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne enterolobii* em raízes de tomate 'Rutgers' sob a interferência de nematoides entomopatogênicos.

Experimento 1				
Trat	IMO ^a	IG ^a	NT ^b	FR ^c
Test	4,5 ± 0,5 a	4,5 ± 0,5 a	782,0 ± 137,7 a	2,6 ± 0,5 a
SB	2,8 ± 0,7 b	2,8 ± 0,7 b	388,2 ± 56,8 b	1,3 ± 0,2 b
SR	1,5 ± 0,5 b	1,5 ± 0,5 b	376,2 ± 50,2 b	1,3 ± 0,2 b
SF	1,8 ± 1,7 b	1,7 ± 1,5 b	450,5 ± 84,1 b	1,5 ± 0,3 b
HA	1,7 ± 1,0 b	1,2 ± 1,1 b	185,8 ± 19,9 d	0,6 ± 0,1 d
HB	2,3 ± 1,0 b	2,0 ± 1,4 b	304,7 ± 77,3 c	1,0 ± 0,3 c

Experimento 2				
Trat	IMO ^a	IG ^a	NT ^b	FR ^c
Test	4,2 ± 0,7 a	4,2 ± 0,7 a	1632,5 ± 296,7 a	5,7 ± 0,5 a
SB	2,7 ± 0,5 b	2,7 ± 0,5 b	770,2 ± 41,3 c	2,6 ± 0,1 c
SR	2,5 ± 0,8 b	2,7 ± 0,8 b	659,0 ± 39,3 c	2,2 ± 0,1 d
SF	2,2 ± 0,9 b	2,3 ± 1,2 b	732,0 ± 42,3 c	2,4 ± 0,1 c
HA	2,7 ± 0,8 b	2,8 ± 1,1 b	641,7 ± 449,0 c	2,1 ± 1,4 d
HB	2,2 ± 1,1 b	2,0 ± 1,1 b	926,50 ± 21,9 b	3,1 ± 0,1 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Test= Testemunha; SB=*Steinernema brazilense*; SF=*S. feltiae*; SR=*S. rarum*; HA=*Heterorhabditis amazonensis*; HB= *H. bacteriophora*. ^a Escala de notas: nota 0 (sem galha/massa de ovo); nota1 (1 a 2 galhas/massa de ovo); nota 2 (3 a 10 galhas/massa de ovo); nota 3 (11 a 30 galhas/massa de ovo); nota 4 (31 a 100 galhas/massa de ovo); nota 5 (mais de 100 galhas/massa de ovo).^b FR= População final (Pf)/ População inicial (Pi).

Interferência de NEPs na mortalidade de J2 de *M. enterolobii*

A mortalidade de *M. enterolobii* na primeira avaliação (2º dia) foi de 76,2 no experimento 1 e 102,7 no experimento 2 com *S. brazilense* (SB) e *S. rarum* (SR) proporcionou mortalidade de 87,2 no experimento 1 e 87,8 no experimento 2, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. No 4º dia, *H. bacteriophora* (HB) proporcionou mortalidade de 121,0 e 154,0 juvenis de *M. enterolobii*. No 6º, 8º e 10º dia não houve diferença estatística entre os tratamentos. De forma geral, verifica-se que a presença dos NEPs na suspensão ocasionou mortalidade dos JI de *M. enterolobii* somente nas duas primeiras avaliações (Tabela 3).

Tabela 3 Mortalidade de juvenis de *M. enterolobii* sob a interferência de nematoides entomopatogênicos.

Experimento 1							
Trat	2º dia	4º dia	6º dia	8º dia	10º dia		
Test	34,0 ± 12,5 aA	26,0 ± 3,7 aA	38,5 ± 15,8 aA	51,7 ± 2,6 aA	86,8 ± 31,3 aB		
SB	76,2 ± 20,2 bB	59,5 ± 10,0 aA	44,5 ± 15,2 aA	29,0 ± 1,9 aA	62,3 ± 23,2 aB		
SR	87,2 ± 14,8 bA	72,0 ± 5,1 aB	59,5 ± 27,9 aA	35,8 ± 14,7 aA	63,7 ± 13,8 aB		
SF	49,2 ± 6,6 aA	71,7 ± 17,7 aB	39,7 ± 16,4 aA	34,8 ± 14,3 aA	62,3 ± 17,5 aB		
HA	30,0 ± 5,9 aA	53,2 ± 11,6 aB	60,7 ± 19,2 aB	34,5 ± 17,9 aB	59,5 ± 9,3 aB		
HB	34,0 ± 5,0 aA	121,0 ± 11,7 bC	56,0 ± 21,6 aB	43,8 ± 15,1 aA	65,2 ± 16,7 aB		

Experimento 2							
Trat	2º dia	4º dia	6º dia	8º dia	10º dia		
Test	60,0 ± 12,2 aA	73,5 ± 37,6 aA	71,0 ± 12,3 aA	114,8 ± 3,9 aB	59,5 ± 14,2 aA		
SB	102,7 ± 12,5 bB	55,5 ± 11,1 aA	49,2 ± 11,3 aA	80,8 ± 6,1 aA	72,3 ± 7,2 aA		
SR	87,8 ± 10,17 bA	51,3 ± 11,1 aA	59,0 ± 9,1 aA	103,0 ± 8,1 aB	71,5 ± 8,5 aA		
SF	47,8 ± 14,0 aA	55,5 ± 14,1 aB	56,3 ± 8,5 aB	97,3 ± 7,9 aB	66,7 ± 13,7 aB		
HA	59,0 ± 12,5 aA	53,8 ± 5,1 aA	56,2 ± 11,2 aA	130,0 ± 21,3 aB	78,0 ± 7,1 aB		
HB	68,5 ± 18,8 aB	154,0 ± 27,5 bB	79,0 ± 8,1 aA	149,8 ± 25,7 aB	66,2 ± 23,2 aA		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Test= Testemunha; SB=*Steinernema brazilense*; SF=*S. feltiae*; SR=*S. rarum*; HA=*Heterorhabditis amazonensis*; HB= *H. bacteriophora*

1.4 Discussão

Os nematoides entomopatogênicos *S. brazilense*, *S. rarum*, *S. feltiae*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* reduziram a eclosão, número de galhas, massa de ovos, número de nematoides totais e fator de reprodução de *M. enterolobii*. Entretanto, somente as espécies *S. brazilense* e *S. rarum* afetaram a sobrevivência dos juvenis, proporcionando maior mortalidade no 2º dia de avaliação e *H. bacteriophora* no 4º dia de avaliação.

A atividade ovicida dos NEPs testados, pode ser atribuído a presença da bactéria simbiote. Os ovos de *M. enterolobii* na suspensão, serviram de estímulo para que os NEPs liberassem suas bactérias. Essas bactérias possivelmente produziram substâncias tóxicas aos ovos do nematoide, reduzindo a eclosão dos juvenis (Grewal et al.,1999; Hu et al.,1999), visto que os ovos de nematoides parasitas de plantas são permeáveis (Perry et al.,1992).

As moléculas proteicas produzidas pela bactéria *Photorhabdus luminescens* presente nos nematoides *H. amazonensis* e *H. bacteriophora*, foram relatadas

apresentando toxidez a *Aphelenchoides rhytium* (Massey), *Bursaphelenchus* spp., *Caenorhabditis elegans*, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner e Buhner, 1934) (Kohn et al., 2007), devido a produção do metabólito secundário, 3,5-di-hidroxi-4-isopropil estilbeno que possui propriedades nematicidas (Grewal et al., 1999). Os demais nematoides, *S. feltiae*, *S. rarum* e *S. brazilense* possuem relação simbiótica com as bactérias do gênero *Xenorhabdus*. Bode (2009), verificou que *Xenorhabdus nematophila* e *Xenorhabdus bovienii* produzem cetonas, amidas e também compostos mais complexos como xenocumarinas (antibióticos) que podem proporcionar efeito tóxico a diversos organismos. Monteiro et al. (2014) relatou que a torta de mamona possui efeito nematicida a *Aphelenchoides besseyi* (Christie, 1942), pois dentre os compostos da torta, o grupo cetona é predominante. Porém, somente *S. feltiae* possui associação com a bactéria *X. bovienii* (Ehlers et al., 1997), os demais NEPs estudados, possuem simbiose com outras espécies de bactérias do mesmo gênero. Porém, acredita-se que de forma geral, todas as bactérias do gênero *Steinernema* produza metabólitos próximos ou semelhantes, pois, espécies de bactérias do gênero *Xenorhabdus* são capazes de produzir uma ampla gama de compostos bioativos, incluindo compostos antimicrobianos, antiparasitários, citotóxicos e inseticidas (Fukruksa et al., 2017). Entretanto, estudos são necessários, para relacionar os compostos produzidos pelas bactérias presentes em *S. brazilense* e *S. rarum*.

A suspensão contendo NEPs inoculada em mudas de tomateiro, proporcionou redução do parasitismo de *M. enterolobii*, refletindo em redução do número de galhas, massa de ovos, número de nematoides totais e fator de reprodução. Grewal et al. (1999) e Hu et al. (1999) observaram que os metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias, atuam na capacidade dos J2 de *Meloidogyne* de localizarem as raízes. Tais metabólitos podem ter influenciado no parasitismo de *M. enterolobii* em raízes de tomateiro, ocasionando menor número de nematoides no sistema radicular, reduzindo consequentemente o número de galhas e massas de ovos.

A presença dos nematoides entomopatogênicos *S. brazilense*, *S. rarum* promoveu maior mortalidade dos juvenis de *M. enterolobii* somente 48 horas após o início do experimento (2º dia). No 4º dia, somente *H. bacteriophora* promoveu maior mortalidade. Isso ocorreu, porque o efeito tóxico dos metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias simbiontes não atuam de forma constante na suspensão. Com o passar do tempo, ocorre declínio das bactérias no ambiente, pois estas não possuem formas de sobrevivência e consequentemente ocorre declínio das moléculas liberadas

(Burnell e Stock, 2000), reduzindo a toxidez aos juvenis de *M. enterolobii*. Entretanto, mesmo com a mortalidade crescente após 96 horas, não diferiu da testemunha, pois provavelmente ocorreu a mortalidade natural dos juvenis que estavam expostos a 25°C em uma suspensão com metabolismo acelerado.

Sendo assim, verifica-se que a redução na eclosão de *M. enterolobii* e a redução do índice de galhas, índices de massa de ovos, número de nematoides totais e fator de produção de *M. enterolobii* pode estar associado a liberação de bactérias simbiotes de *S. brasilense*, *S. rarum*, *S. feltiae*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora*. Os resultados obtidos demonstram o potencial da utilização de NEPs em programas de manejo integrado de *M. enterolobii*.

1.5 Conclusão

Os nematoides entomopatogênicos *S. brasilense*, *S. rarum*, *S. feltiae*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* reduziram a eclosão de *M. enterolobii*. *S. brasilense* e *S. rarum* afetaram a sobrevivência de *M. enterolobii* 24 horas após a instalação do experimento proporcionando maior mortalidade dos juvenis e *H. bacteriophora* proporcionou maior mortalidade após 96 horas.

A inoculação dos NEPs em vasos, reduziram o parasitismo de *M. enterolobii* em raízes de tomateiro, resultando em menor índice de galhas, massa de ovos, nematoides totais e fator de reprodução.

REFERÊNCIAS

Bode, H. B. 2009. Entomopathogenic bacteria as source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology* 13:224-230.

Brito, J. A., Stanley, J. D., Kaur, R., Cetintas, R., Di Vito, M., Thies, J. A., e Dickson, D. W. 2007. Effects of the Mi-1, N and Tabasco genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *Journal of nematology* 39:327-329.

Burnell A. M., e Stock P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and Their Bacterial Symbionts - Lethal Pathogens of Insects. *Nematology* 1:31-42.

- Cantu, R. R., Wilcken, S. R. S., Rosa, J. M. O., e Goto, R. 2009. Reação de portaenxertos de tomateiros a *Meloidogyne mayaguensis*. Summa Phytopathologica 35:124-126.
- Carneiro, R. M. D. G., Almeida, M. R. A., Braga, R. S., Almeida, C. A., e Gloria, R. 2006. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à meloidoginose no Estado de São Paulo. Nematologia Brasileira 30:81-86.
- Chen, S.Y., e Dickson, D.W. 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of heterodera glycines. Journal of Nematology 32:117-121.
- Christie, J. R. 1942. "A description of *Aphehnchoides besseyi* n.sp. the summerdwarf nematode of strawberries, with comments on the identity of *Aphehnchoides subtenuis* (Cobb, 1926) and *Aphehnchoides hodsoni* Goodcy, 1935". Proc. helminth. Soc. Wash 9: 82–84.
- Ehlers, R. U., Wulff, A., e Peters, A. 1997. Pathogenicity of Axenic *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii*, and the Bacto–Helminthic Complex to Larvae of *Tipula oleracea* (Diptera) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera). Journal of invertebrate pathology 69:212-217.
- Fukrukusa, C., Yimthin, T., Suwannaroj, M., Muangpat, P., Tandhavanant, S., Thanwisai, A., e Vitta, A. 2017. Isolation and identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria associated with entomopathogenic nematodes and their larvicidal activity against *Aedes aegypti*. Parasites & vectors 10:440-450.
- Grewal, P. S., Lewis, E. E. e 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, J. M. 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. Nematology 5:457–69.
- Hu, K., Li, J., e Webster, J.M. 1995. Mortality of plant-parasitic nematodes caused by bacterial (*Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus luminescens*) culture media. Journal of Nematology 7:502–503.
- Hussey, R.S., e Barker, K.R.A. 1973. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025–1028.
- IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <https://ibge.gov.br/>>. Acesso em: 07 jan. 2019.
- Kohno, T., Togashi, K., e Fukamiya, N. 2007. The nematicidal activity and the structure-activity relationships of stilbenes. Natural Products Research 21:606-615.
- Kurozawa, C., e Pavan, M. A. 2005. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI, H. et al. (Eds.) Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres. p.607-626.

Monteiro, A. T. S., Nasu, G. C. E., Guimarães, C. C., Neves, S. W., Mizobutsi, H. E., e Freitas, G. L. 2014. Redução de inóculo de *Aphelenchoides besseyi* em sementes de *Brachiaria brizantha* tratadas com óleos essenciais. *Ciência Rural* 7:44-49.

Perry, R. N., Knox, D. P., e Beane, J. 1992. Enzymes released during hatching of *Globodera rostochiensis* and *Meloidogyne incognita*. *Fundamental and Applied Nematology* 15:283-288.

Perry, R.M., e Moens, M. *Plant nematology*. Wallingford. CAB International. 2006. 463 p.

Poinar, G.O. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H. K. (eds). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL. CRC Press, p. 23-61.

R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Rosa, J. M. O., Westerich, J. N., e Wilcken, S. R. 2015. Reprodução de *Meloidogyne javanica* em olerícolas e em plantas utilizadas na adubação verde. *Revista Ciência Agronômica* 46:826-835.

Silva, J. C. P., Terra, W. C., Freire, E. S; Campos, V. P., e Castro, J. M. C. D. A. 2014. Aspectos gerais e manejo de *Meloidogyne enterolobii*. In: *Sanidade de Raízes / NEFIT – Núcleo de estudos em Fitopatologia – 1ª edição – São Carlos, SP* Suprema Grafia e Editora, p. 59-77.

Southey, J. F. 1986. *Principles of sampling for nematodes: laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

Steiner, G., e Buhrer, E. M. 1934. *Aphelenchoides xylophilus* n. sp., a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *Journal of Agricultural Research* 48:949-951.

Taylor, A. L., e Sasser, J. N. 1978. *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. Raleigh: North Carolina State University.

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66:302-303.

Yang, B., e Eisenback, J.D. 1983. *Meloidogyne enterolobii* sp. (Meloidogynidae) a root-knot nematode parasiting pacara earpod tree in China. *Journal of Nematology* 15:381-391.

CAPÍTULO 2

Supressão de *Meloidogyne enterolobii* por nematoides entomopatogênicos

(Artigo redigido conforme normas da Revista Biological Control)

Resumo

Na busca de alternativas para o manejo de áreas infestadas com nematoides fitoparasitas, o controle biológico tem demonstrado resultados satisfatórios. Dentre os organismos que atuam no controle biológico de fitonematoídeos, os nematoides entomopatogênicos tem apresentado resultados positivos. Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a supressão de *Meloidogyne enterolobii* pelos NEPs *Steinernema brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *Heterorhabditis amazonensis* e *H. bacteriophora* em plantas de tomateiro 'Rutgers' em casa de vegetação. Mudanças de tomateiro, foram inoculados ao mesmo tempo 500 ovos de *M. enterolobii* e eventuais juvenis de segundo estágio suspensos em 2 mL de água e NEPs também aplicados em 2 mL de água, nas concentrações 0 (somente água), 100, 500, 1.000 e 5.000 juvenis de fase infectante. Sessenta dias após a inoculação, o sistema radicular de cada planta foi lavado em água corrente e submetido à coloração com Floxina B para a obtenção dos índices de galhas (IG) e índices de massas de ovos (IMO). Além disso, o sistema radicular foi pesado e cortado em pedaços pequenos para extração dos ovos e eventuais juvenis de segundo estágio. O número total de ovos e juvenis de *M. enterolobii* por sistema radicular foi quantificado e calculado o fator de reprodução. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizados, em esquema de fatorial duplo, com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa R Development Core Team. A utilização de nematoides entomopatogênicos *S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* na concentração de 5.000 juvenis por vaso atuam no manejo de *M. enterolobii* promovendo redução do número de galhas, massa de ovos, número total de nematoides e fator de reprodução. De forma geral, a concentração de 5.000 juvenis por vaso propiciou melhores resultados. Entretanto, *S. feltiae* em baixa concentração (100 juvenis por vaso) se destaca por proporcionar redução em todos os parâmetros avaliados.

Palavras-chaves: Nematóide Fitoparasita. Parasitismo. Multiplicação. Manejo.

Suppression of *Meloidogyne enterolobii* by entomopathogenic nematodes

Abstract

In the search for alternatives to the management of areas infested with phytopathogenic nematodes, biological control has shown satisfactory results. Among the organisms that act in the biological control of phytonematoids, the entomopathogenic nematodes have presented positive results. Thus, the objective of this work was to evaluate the suppression of *Meloidogyne enterolobii* by EPNs *Steinernema brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *Heterorhabditis amazonensis* and *H. bacteriophora* in greenhouse 'Rutgers' tomato plants. At the same time 500 eggs of *M. enterolobii* and possible juveniles of second stage suspended in 2 mL of water and EPNs were also inoculated in 2 mL of water at concentrations 0 (water only), 100, 500, 1.000 and 5.000 infective phase juveniles. Sixty days after inoculation, the root system of each plant was washed in running water and subjected to floxin B staining to obtain gall indexes (GI) and egg mass indexes (EMI). In addition, the root system was weighed and cut into small pieces for egg extraction and occasional second stage juveniles. The total number of eggs and juveniles of *M. enterolobii* per root system was quantified and the reproduction factor was calculated. The experiments were conducted in a completely randomized experimental design with a double factorial scheme with six replications. The data were submitted to analysis of variance, comparing the means by the Tukey test at 5% of probability. The analyzes were carried out in the R Development Core Team program (2009). The use of entomopathogenic nematodes *S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* and *H. bacteriophora* in the concentration of 5.000 juveniles per vessel act in the management of *M. enterolobii* promoting reduction of the number of galls, egg mass, number total nematodes and reproduction factor. In general, the concentration of 5.000 juveniles per pot gave better results. However, *S. feltiae* at low concentration (100 juveniles per pot) is notable for providing reduction in all evaluated parameters.

Key words: Phytopathogenic nematode. Parasitism. Multiplication. Management.

1.1 Introdução

Muitas espécies de nematoides são importantes na agricultura. Em áreas de cultivo de olerícolas, os maiores problemas nematológicos são atribuídos aos nematoides-das-galhas, *Meloidogyne* spp., pela ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros e pelo alto poder destrutivo (Mukhtar et al., 2013).

O controle de nematoides parasitos de plantas (NPP) é difícil. Sendo assim, é necessário o uso de estratégias que visem à sustentabilidade da produção por meio da redução de níveis populacionais (Steyn et al., 2014; Youssef e El-Nagdi, 2015). Na busca por alternativas para o manejo de áreas infestadas, o controle biológico tem apresentado resultados promissores (Coimbra e Campos, 2005; Araujo e Marchesi, 2009).

Dentre os organismos que atuam no controle biológico de fitonematoides, os nematoides entomopatogênicos (NEPs) se apresentam como uma alternativa para o manejo (Lewis e Grewal, 2005). Os NEPs pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* e *Steinernema* (Nematoda: Heterorhabditidae e Steinernematidae) são utilizados no controle biológico de insetos-pragas. Os juvenis infectivos (Jis) penetram no inseto através de aberturas naturais (cavidade bucal, ânus ou espiráculos) ou através da cutícula (Poinar, 1990) e liberam bactéria simbiótica do trato digestivo matando o hospedeiro por septicemia entre 48 a 72 horas após a infecção (Burman, 1982; Akhurst e Boemare, 1990).

O antagonismo entre NEPs e fitonematoides foi primeiramente documentado por Bird e Bird (1986), entretanto, nos últimos anos, diversos trabalhos têm relatado o efeito supressivo desses organismos sobre NPP (Shapiro-Ilan et al., 2006; Molina et al., 2007). O efeito supressivo possivelmente está relacionado à competição entre os dois grupos de nematoides (Bird e Bird, 1986; Ishibashi e Kondo, 1986; Jagdale et al., 2002) e a liberação de metabólitos tóxicos produzidos por NEPs e/ou por suas bactérias simbiontes que intoxicam e repelem os nematoides parasitas de plantas, reduzindo o parasitismo (Grewal et al., 1999; Hu et al., 1999). Porém, há controvérsia sobre o uso de NEPs e suas bactérias simbiontes no controle de fitonematoides, sendo necessários estudos que comprovem se existe efeito na penetração e reprodução dos fitonematoides (Lewis e Grewal, 2005).

Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a supressão de *Meloidogyne enterolobii* pelos NEPs *Steinernema brazilense* PONTO2C, *S. feltiae* (Filipjev)

IBCB47, *S. rarum* (Doucet) PAM25 (Rhabditida: Steinernematidae), *Heterorhabditis amazonensis* IBCB10 e *H. bacteriophora* (Poinar) HB (Rhabditida: Heterorhabditidae) em plantas de tomateiro 'Rutgers' em casa de vegetação.

1.2 Material e Métodos

O experimento foi instalado em casa de vegetação do laboratório de Nematologia Agrícola do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu-SP.

A população pura de *M. enterolobii* utilizada nos experimentos foi obtida de plantas de tomates mantidas em casa de vegetação como fonte de inoculo e multiplicada em tomate 'Rutgers' em potes de 1.000 cm³ contendo substrato composto de solo, areia e matéria orgânica na proporção de 1: 2: 1 (v: v: v), previamente esterilizado em autoclave (120 °C por 2 h). Os ovos do nematoide foram extraídos de raízes de tomate 'Rutgers' pelo método de Hussey e Barker (1973) e a concentração de suspensão determinada com o auxílio da câmara de Peters sob um microscópio óptico.

As populações de NEPs foram obtidas da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos do Banco do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil. Os juvenis infectantes (JIs) de *S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* foram multiplicados em larvas de terceiro a quinto instar de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). Foram utilizadas cinco larvas por placa de Petri (9 cm de diâmetro) revestidas com papel de filtro umedecido com uma suspensão de nematoides à concentração de 500 JIs / cm². As larvas mortas de *D. saccharalis* foram transferidas para a armadilha de White (White, 1927) e armazenadas em câmara incubadora (BOD) a 25 °C. Os JIs foram obtidos deste hospedeiro e coletados em um filme de água (1 cm de profundidade) em Erlemeyers, mantidos em câmara de BOD a temperatura de 18 ° C, 70% de HR e usado até dois dias após a coleta.

As sementes de tomate 'Rutgers' foram colocadas para a germinação em bandejas de polipropileno com 128 células contendo substrato. Após a germinação, as plântulas de tomate foram transplantadas para vasos contendo 5L (10 cm de

diâmetro) de substrato autoclavado, composto por solo, areia e matéria orgânica (1:1:1) previamente esterilizado em autoclave (120 °C por 2 h).

Quatro dias após o transplante das mudas, NEPs e *M. enterolobii* foram inoculados ao mesmo tempo às mudas de tomate 'Rutgers'. Um total de 500 ovos de *M. enterolobii* e juvenis do segundo estágio foram suspensos em 2 mL de água e aplicados próximo as raízes de cada planta de tomate. Os tratamentos de NEPs (também aplicados em 2 mL de água) 0 (somente água), 100, 500, 1.000 e 5.000 juvenis de fase infectante foram aplicados na superfície do solo.

Sessenta dias após a inoculação, o sistema radicular de cada planta foi lavado em água corrente e submetido à coloração com Floxina B para a obtenção dos índices de galhas (IG) e índices de massas de ovos (IMO) de acordo com a escala de notas proposta por Taylor e Sasser (1978), em que: nota 0 = sem galhas ou massas de ovos; nota 1 = 1 a 2 galhas ou massas de ovos; nota 2 = 3 a 10 galhas ou massas de ovos; nota 3 = 11 a 30 galhas ou massas de ovos; nota 4 = 31 a 100 galhas ou massas de ovos e nota 5 = mais de 100 galhas ou massas de ovos por raiz.

O sistema radicular foi pesado e cortado em pedaços pequenos (aproximadamente 1 cm de comprimento) para extração dos ovos. O processamento do sistema radicular foi realizado pelo método descrito por Hussey e Barker (1973) em que o sistema radicular é triturado em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio, seguida de peneiramento. O número total de ovos e juvenis de *M. enterolobii* por sistema radicular foi quantificado com o auxílio de um microscópio de luz e de lâminas de Peters. O fator de reprodução foi calculado através da fórmula $FR = PF / PI$, onde PF = população final do nematoide e PI = população inicial do nematoide. Para maior confiabilidade dos dados, os experimentos foram conduzidos duas vezes.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizados, em esquema de fatorial duplo, com seis repetições. Os tratamentos foram avaliados como Fator 1, enquanto que as concentrações como Fator 2. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa R Development Core Team (2009).

1.3 Resultados

Foi observado interação significativa entre os tratamentos (Fator 1) e concentrações (Fator 2) na análise do índice de galhas (IG) no experimento 1 e no experimento 2 ($p=0.004$ e 0.002 respectivamente) (Tabela 1). Todas as concentrações estudadas promoveram redução do índice de galhas para *S. rorum* e *S. feltiae* diferindo estatisticamente das testemunhas (concentração 0). Para *S. brazilense* e *H. bacteriophora*, as concentrações 500, 1.000 e 5.000 JI por vaso foram as que reduziram o índice de galhas em raízes de tomateiro. Em contrapartida, somente a concentração de 5.000 JI por vaso promoveu redução do número de galhas no tratamento utilizando *H. amazonensis*.

Tabela 1 Índice de galhas (IG) em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação de *Meloidogyne enterolobii* e diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos (NEPs).

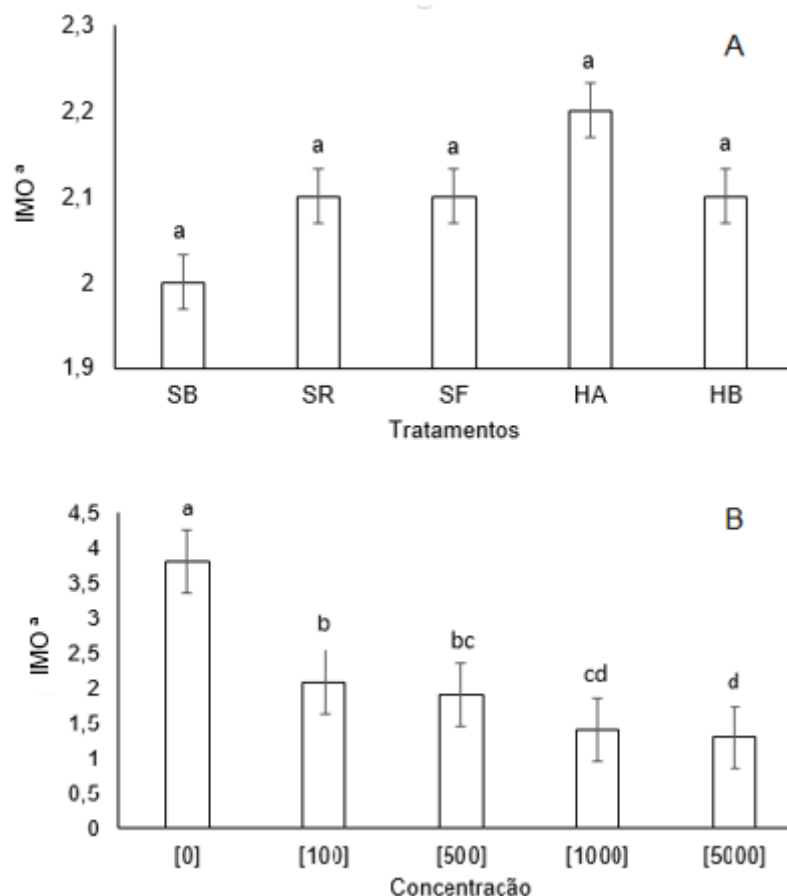
IG ^a - EXPERIMENTO 1					
Trat Conc	SB	SR	SF	HA	HB
0	4,3 ± 0,5 aA	4,3 ± 0,5 aA	4,3 ± 0,5 aA	4,3 ± 0,5 aA	4,3 ± 0,5 aA
100	3,8 ± 0,7 abA	2,3 ± 0,5 bB	2,3 ± 0,5 bB	3,3 ± 0,8 aAB	4,2 ± 0,5 aA
500	3,0 ± 0,8 bB	2,2 ± 0,7 bB	2,7 ± 0,6 bB	3,3 ± 1,0 aA	2,7 ± 0,8 bB
1000	2,8 ± 0,7 bB	1,8 ± 1,0 bC	2,0 ± 0,7 bBC	3,6 ± 0,7 aA	3,0 ± 0,8 bB
5000	1,7 ± 0,8 cA	2,0 ± 1,2 bA	2,0 ± 0,5 bA	1,8 ± 0,7 bA	2,2 ± 0,6 bA

IG ^a - EXPERIMENTO 1					
Trat Con	SB	SR	SF	HA	HB
0	3,5 ± 0,5 aA	3,5 ± 0,5 aA	3,5 ± 0,5 aA	3,5 ± 0,5 aA	3,5 ± 0,5 aA
100	3,3 ± 1,3 abA	2,2 ± 0,7 bB	2,0 ± 1,0 bB	3,0 ± 0,6 aAB	3,3 ± 0,5 aA
500	2,5 ± 0,5 bB	2,2 ± 0,5 bB	2,1 ± 0,8 bB	3,1 ± 1,0 aA	2,7 ± 1,1 bB
1000	2,2 ± 0,4 bB	2,0 ± 0,6 bB	2,2 ± 0,7 bB	2,6 ± 0,8 aA	2,2 ± 0,5 bB
5000	2,0 ± 0,6 bA	2,1 ± 0,4 bA	2,1 ± 0,5 bA	2,0 ± 0,8 bA	2,5 ± 0,5 bA

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

SB=*Steinernema brazilense*; SF=*S. feltiae*; SR=*S. rorum*; HA=*Heterorhabditis amazonensis*; HB= *H. bacteriophora*. ^aEscala de notas: nota 0 (sem galha/massa de ovo); nota1 (1 a 2 galhas/massa de ovo); nota 2 (3 a 10 galhas/massa de ovo); nota 3 (11 a 30 galhas/massa de ovo); nota 4 (31 a 100 galhas/massa de ovo); nota 5 (mais de 100 galhas/massa de ovo).

Não ocorreu interação entre os fatores no índice de massa de ovos (IMO) no experimento 1 ($p= 0.212$). Sendo assim, os efeitos foram analisados separadamente (Figura 1). Nota-se que, não ocorreu diferença significativa entre os NEPs testados. Entretanto, independente da espécie, todas as concentrações testadas diferem-se da testemunha. A concentração de 5.000 JI por vaso, se destaca pois promoveu a redução do índice de massa de ovos de *M. enterolobii* para 1,5.



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

Figura 1 Índice de massa de ovos (IMO) de *Meloidogyne enterolobii* em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação com diferentes (A) espécies de nematoides entomopatogênicos (NEPs) e (B) diferentes concentrações de NEPs (Experimento 1). SB=*Steinernema brazilense*; SF=*S. feltiae*; SR=*S. rarum*; HA=*Heterorhabditis amazonensis*; HB= *H. bacteriophora*. ^aEscala de notas: nota 0 (sem galha/massa de ovo); nota 1 (1 a 2 galhas/massa de ovo); nota 2 (3 a 10 galhas/massa de ovo); nota 3 (11 a 30 galhas/massa de ovo); nota 4 (31 a 100 galhas/massa de ovo); nota 5 (mais de 100 galhas/massa de ovo).

No experimento 2, foi observado interação significativa entre os tratamentos e as concentrações ($p=0,018$) (Tabela 2). A inoculação das espécies de *S. brazilense*, *S. rarum*, *S. feltiae*, e *H. bacteriophora* promoveram redução no índice de massa de ovos na concentração de 100 JI e nas demais concentrações testadas diferindo da concentração 0 (testemunha). Porém, para *H. amazonensis*, a redução no índice de massa de ovos ocorreu na concentração de 1.000 e 5.000 JI por vaso, diferindo estatisticamente das demais concentrações estudadas.

Tabela 2 Índice de massa de ovos (IMO) de *Meloidogyne enterolobii* em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação com diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos (NEPs) (Experimento 2).

IMO ^a - EXPERIMENTO 2					
Trat Conc	SB	SR	SF	HA	HB
0	3,2 ± 0,4 aA	3,2 ± 0,4 aA	3,2 ± 0,4 aA	3,2 ± 0,4 aA	3,2 ± 0,4 aA
100	1,3 ± 0,8 bB	1,7 ± 0,5 bB	1,8 ± 0,8 bB	2,5 ± 0,5 abA	1,7 ± 0,5 cB
500	1,5 ± 0,5 bB	1,8 ± 0,8 bB	2,0 ± 0,6 bB	2,3 ± 1,0 abA	2,0 ± 0,8 bcB
1000	1,2 ± 0,6 bA	1,8 ± 0,9 bA	1,8 ± 1,0 bA	1,8 ± 0,4 bA	1,7 ± 0,8 cA
5000	1,3 ± 0,8 bA	1,3 ± 0,5 bA	1,3 ± 0,5 bA	1,5 ± 0,5 bA	1,6 ± 0,6 cA

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

SB=*Steinernema brazilense*; SF=*S. feltiae*; SR=*S. rarum*; HA=*Heterorhabditis amazonensis*; HB= *H. bacteriophora*. ^aEscala de notas: nota 0 (sem galha/massa de ovo); nota1 (1 a 2 galhas/massa de ovo); nota 2 (3 a 10 galhas/massa de ovo); nota 3 (11 a 30 galhas/massa de ovo); nota 4 (31 a 100 galhas/massa de ovo); nota 5 (mais de 100 galhas/massa de ovo).

Na análise do número total de nematoides (NT) foi observado interação significativa entre os fatores (tratamento x concentração) no experimento 1 e no experimento 2 ($p= 0, 0001$ e $1,108 \times 10^{-12}$ respectivamente) (Tabela 3). Todas as concentrações estudadas, diferiram-se estatisticamente da testemunha (concentração 0) em todos os tratamentos, resultando em menor número de nematoides totais.

O nematoide *S. feltiae* na concentração de 100 e 500 JI por vaso se destacou por proporcionar uma maior redução no número de nematoides totais. Já na concentração de 1.000 JI por vaso, *S. feltiae* e *S. rarum*, *H. amazonensis*, *H. bacteriophora* apresentaram os melhores resultados. Por fim, na concentração de 5.000 JI por vaso não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p<0,05$).

Sendo assim, verifica-se que na maior concentração (5.000 JI por vaso) ocorreu a maior redução do número de nematoides totais.

Tabela 3 Número total (NT) de *Meloidogyne enterolobii* em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação com diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos (NEPs).

NT - EXPERIMENTO 1										
Trat Conc	SB		SR		SF		HA		HB	
0	5181,2 (1307,2)	Aa	5181,2 (1307,2)	aA	5181,2 (1307,2)	aA	5181,2 (1307,2)	aA	5181,2 (1307,2)	aA
100	3045,8 (857,4)	bA	2462,5 (945,2)	bAB	1480,0 (717,3)	bB	2760,0 (924,1)	bAB	2611,0 (558,9)	bAB
500	2508,3 (735,1)	bA B	2447,0 (432,2)	bA	1209,2 (632,0)	bB	2149,2 (1059,9)	bAB	1908,3 (860,3)	bcAB
1000	2333,3 (868,1)	bA	1206,0 (393,4)	bcB	1100,0 (444,1)	bcB	1456,7 (874,8)	bB	1126,0 (380,4)	cB
5000	1650,0 (840,1)	cA	422,0 (810,2)	cA	1033,8 (769,2)	cA	246,3 (110,4)	cA	400,0 (138,7)	dA

NT - EXPERIMENTO 2										
Trat Conc	SB		SR		SF		HA		HB	
0	5261,7 (1593,1)	aA	5261,7 (2593,1)	aA	5261,7 (1593,1)	aA	5261,7 (2593,1)	aA	5261,7 (2593,1)	aA
100	2750,0 (875,1)	bc A	1965,0 (405,7)	bcA B	1345,0 (617,2)	bB	1733,1 (1009,0)	bAB	2187,5 (361,2)	bAB
500	2204,0 (121,8)	bc A	666,7 (430,9)	cAB	481,3 (39,9)	bB	587,5 (88,6)	bAB	1686,0 (235,2)	bA
1000	846,0 (144,6)	cA	390,0 (1139,6)	cdB	487,3 (136,9)	bB	609,0 (226,9)	bB	657,5 (530,4)	bB
5000	420,0 (1277,1)	dA	165,0 (64,5)	dA	325,0 (213,2)	cA	442,0 (219,7)	cA	345,0 (111,6)	cA

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

SB=*Steinernema brazilense*; SF=*S. feltiae*; SR=*S. rarium*; HA=*Heterorhabditis amazonensis*; HB= *H. bacteriophora*.

Na análise do fator de reprodução (FR), foi observado interação significativa entre os fatores (tratamento x concentração) no experimento 1 e no experimento 2 ($p = 1,082 \times 10^{-5}$ e $1,111 \times 10^{-12}$ respectivamente) (Tabela 4). Todos os NEPs testados reduziram significativamente o fator de reprodução de *M. enterolobii*. Na concentração de 100 JI e 500 JI por vaso, *S. feltiae* se apresentou como a melhor espécie por apresentar menor fator de reprodução. De forma geral, a concentração de 5.000 JI

para todos os nematoides, promoveu maior redução do fator de reprodução de *M. enterolobii*.

Tabela 4 Fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne enterolobii* em raízes de tomateiro sessenta dias após a inoculação com diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos (NEPs).

FR ^a - EXPERIMENTO 1											
Conc	Trat	SB		SR		SF		HA		HB	
0		10,4 ± 2,6	aA	10,4 ± 2,6	aA	10,4 ± 2,6	aA	10,4 ± 2,6	aA	10,4 ± 2,6	aA
100		6,1 ± 1,7	bA	4,9 ± 1,9	bAB	3,0 ± 1,4	bB	5,5 ± 7,8	bAB	5,2 ± 1,1	bAB
500		5,0 ± 1,4	bAB	4,9 ± 2,9	bA	2,4 ± 9,2	bB	4,3 ± 2,1	bAB	3,8 ± 1,7	bcAB
1000		4,5 ± 3,7	bA	2,4 ± 0,8	bcB	2,2 ± 8,9	bcB	3,0 ± 3,7	bB	2,3 ± 2,7	cB
5000		3,3 ± 1,7	cA	0,8 ± 1,6	cA	2,1 ± 1,5	cA	0,5 ± 1,2	cA	0,8 ± 0,2	dA
FR ^a - EXPERIMENTO 2											
Conc	Trat	SB		SR		SF		HA		HB	
0		10,5 ± 5,1	aA	10,5 ± 5,1	aA	10,5 ± 1,2	aA	10,5 ± 5,1	aA	10,5 ± 5,1	aA
100		5,5 ± 1,7	bcA	4,0 ± 0,8	bcAB	2,7 ± 0,9	bB	3,5 ± 2,0	bAB	4,4 ± 0,7	bAB
500		4,4 ± 2,2	bcA	1,3 ± 0,9	cAB	1,0 ± 0,3	bB	1,2 ± 0,1	bAB	3,4 ± 0,5	bA
1000		1,3 ± 0,3	cA	0,8 ± 0,3	cdB	1,0 ± 0,4	bB	1,4 ± 0,5	Bb	1,7 ± 1,1	bB
5000		0,8 ± 0,4	dA	0,3 ± 0,4	dA	0,7 ± 0,5	cA	0,9 ± 1,2	cA	0,7 ± 0,2	cA

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

SB=*Steinernema brazilense*; SF=*S. feltiae*; SR=*S. rarum*; HA=*Heterorhabditis amazonensis*; HB= *H. bacteriophora*. ^aEscala de notas: nota 0 (sem galha/massa de ovo); nota1 (1 a 2 galhas/massa de ovo); nota 2 (3 a 10 galhas/massa de ovo); nota 3 (11 a 30 galhas/massa de ovo); nota 4 (31 a 100 galhas/massa de ovo); nota 5 (mais de 100 galhas/massa de ovo). ^aFR= População final (Pf)/ População inicial (Pi).

1.4 Discussão

Os nematoides entomopatogênicos *S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* atuam no manejo de *M. enterolobii* promovendo redução do número de galhas, massa de ovos, número total de nematoides e fator de reprodução.

A concentração de 5.000 JI por vaso reduziu o número de galhas em todas as espécies de NEPs testadas, possivelmente porque os metabólitos tóxicos produzidos

pelas bactérias simbiotes dos NEPs atuam na capacidade dos juvenis de localizarem as raízes, reduzindo o parasitismo e o número de galhas em raízes (Grewal et al., 1999; Hu et al., 1999). Entretanto, uma baixa concentração de NEPs (100 JI) de *S. feltiae* e *S. rarum* promoveu redução do número de galhas em raízes de tomateiro. Perez e Lewis (2004) observaram que *S. feltiae* foi eficiente no manejo de *Meloidogyne hapla* (Chitwood) em que somente pré-aplicações diminuiu a penetração do nematoide em tomateiros (Perez e Lewis, 2004). A alta eficiência de *S. feltiae* pode estar relacionado com a eficiência de sua bactéria *Xenorhabdus bovienii* (Ehlers et al., 1997). Essa bactéria possui a capacidade de produzir cetonas, amidas e também compostos mais complexos como xenocumarinas (antibióticos) que apresentam efeitos tóxicos a diversos organismos. Porém, a bactéria associada a *S. rarum*, conhecida como *Xenorhabdus szentirmaii* foi isolada, porém não se conhece até o momento os compostos específicos produzidos por ela. De forma geral, por pertencer ao gênero *Xenorhabdus*, *X. szentirmaii* possui a capacidade de produzir e liberar metabólitos tóxicos a juvenis de *M. enterolobii*, pois todas as espécies estudadas deste gênero são capazes de produzir uma ampla gama de compostos bioativos, incluindo compostos antimicrobianos, antiparasitários, citotóxicos e inseticidas (Fukruksa et al., 2017).

Na avaliação do índice de massa de ovos, verificou-se todas as espécies nas concentrações de 5.000 JI por vaso, reduziram o número de massa de ovos em raízes de tomateiro. A redução da massa de ovos pode estar relacionada com a redução do número de juvenis eclodidos na solução do solo, reduzindo o parasitismo (Lewis et al., 2001), pois que os ovos de *M. enterolobii* presentes na solução do solo podem servir de estímulo para a liberação das bactérias simbiotes dos NEPs, reduzindo o número de juvenis eclodidos (Ferreira et al., 2009). Além disso, a produção de metabólitos tóxicos pelas bactérias podem ter atuado na capacidade dos juvenis de *M. enterolobii* localizarem as raízes (Grewal et al., 1999; Hu et al., 1999). Alguns autores afirmam que a redução da produção de ovos, pode resultar em menores taxas de reinfecção, reduzindo o número de massa de ovos e de galhas radiculares em plantas (Somasekhar et al., 2002, Lewis et al., 2001, Molina et al., 2007, Shapiro-Ilan et al., 2006).

Com a redução do número de juvenis parasitando o sistema radicular, possivelmente afetou a oviposição pelas fêmeas, gerando menor número de indivíduos (Ferreira et al., 2009). Sendo assim, o fator de reprodução de *M. enterolobii*

em plantas de tomateiro conseqüentemente foi reduzido em decorrência do menor número de indivíduos gerados. Entretanto, dentre as espécies testadas, *S. feltiae* na menor concentração (100 JI) se destacou por apresentar maior redução no número de nematoides totais e fator de reprodução, devido aos compostos tóxicos produzidos por sua bactéria simbiote, *X. bovienii*. Sendo assim, verifica-se que a supressão de *M. enterolobii* pelas espécies de nematoides entomopatogênicos testadas, pode estar relacionada com a liberação das bactérias simbióticas do gênero *Photorhabdus* sp. e *Xenorhabdus* sp., que produzem e liberam metabólitos tóxicos.

Este trabalho indica que existe potencial do uso de NEPs (*S. brazilense*, *S. feltiae*, *S. rarum*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora*) no controle biológico de *Meloidogyne enterolobii* sp. Dentre as espécies, *S. feltiae* se destaca por apresentar bons resultados em uma baixa concentração estudada (100 JI por vaso) em todos os parâmetros avaliados. Estudos adicionais precisam ser realizados para adequação da metodologia necessária para aplicação (métodos, dosagens, época) dos NEPs em áreas maiores. As propriedades nematicidas de aplicações de nematoides entomopatogênicos pode ser uma alternativa no manejo nematoides parasitas de plantas, especialmente considerando a falta de produtos químicos eficientes no mercado para manejo de *M. enterolobii*.

1.5 Conclusão

Os nematoides entomopatogênicos *S. brazilense*, *S. rarum*, *S. feltiae*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* reduzem o número de galhas, massa de ovos, nematoides totais e fator de reprodução de *M. enterolobii* em casa de vegetação.

S. feltiae em baixa concentração (100 JI por vaso) se destaca por proporcionar redução em todos os parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

Akhurst, R., Boemare, N.E., 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 75–87.

- Araujo, F.F., Marchesi, G V.P., 2009. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. *Ciência Rural*. 39, 1558-1561.
- Bird, A. F., Bird, J., 1986. Observations on the use of insectparasitic nematodes as a means of biological control on root-knot nematodes. *Journal of Parasitology*. 16, 511-516.
- Burman, M., 1982. *Neoplectana carpocapsae*: a toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematologica*. 28, 62–70.
- Coimbra, J.L., Campos, V.P., 2005. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. *Fitopatologia Brasileira*. 30, 232-238.
- Ehlers, R. U., Wulff, A., Peters, A., 1997. Pathogenicity of Axenic *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii*, and the Bacto–Helminthic Complex to Larvae of *Tipula oleracea* (Diptera) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Journal of invertebrate pathology*. 69, 212-217.
- 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, 20 Congresso Internacional de Nematologia Tropical. Resumos, p. 31.
- Fukruksa, C., Yimthin, T., Suwannaroj, M., Muangpat, P., Tandhavanant, S., Thanwisai, A., Vitta, A., 2017. Isolation and identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria associated with entomopathogenic nematodes and their larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*. 10, 440-450.
- Grewal, P.S., Lewis, E.E. e Ventachari, S., 1999. Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology*. 1, 735-743.
- Hu, K., Li, J., Webster, J. M., 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology*. 5, 457–69.
- Hussey, R.S., Barker, K.R.A., 1973. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*. 57, 1025–1028.
- Ishibashi, N., Kondo, E., 1986. *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: Persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. *Journal of Nematology*. 18, 310-316.
- Jagdale, G.B., Somasekhar, N., Grewal, P.S., 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., Grewal, P. S., 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.
- Lewis, E.E.; Grewal, P.S., 2005. Interactions with plantparasitic nematodes. In: Grewal, P.S.; Ehlers, R.U.; Shapiro-Ilan, D. I. *Nematodes as biocontrol agents*. New York: CABI, p. 349-362.
- 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, 338–342.
- Mukhtar, T., Arshad, I., Kayani, M.Z., Hussain, M.A., Kayani, S.B., Rahoo, A.L., Ashfaq, M., 2013. Estimation of damage to okra (*Abelmoschus esculentus*) by root-knot disease incited by *Meloidogyne incognita*. *Pakistan Journal of Botany*. 45, 1023-1027.
- Perez, 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.
- Poinar, G.O., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H. K. (eds). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, Fl. CRC Press, p. 23-61.
- R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- 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.
- 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.
- Steyn, W.P., Daneel, M.S., Slabbert, M.M., 2014. Host suitability and response of different vegetable genotypes to *Meloidogyne incognita* race 2 and *Meloidogyne javanica* in South Africa. *International Journal of Pest Management*. 60, 59–66.
- Taylor, A. L., Sasser, J. N., 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh: North Carolina State University.
- White, G. F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*. 66, 302-303.
- Youssef, M.M.A., El-Nagdi, W.M.A., 2015. Host status of some imported sugar beet varieties to *Meloidogyne incognita* in Egypt. *Pakistan Journal of Nematology*. 33, 167-171.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nesta dissertação contribuem de maneira significativa no que se refere ao manejo integrado de *M. enterolobii* utilizando nematoides entomopatogênicos.

Os nematoides entomopatogênicos *S. brazilense*, *S. rarum*, *S. feltiae*, *H. amazonensis* e *H. bacteriophora* reduzem a eclosão de *M. enterolobii*, porém não afetam a mortalidade dos juvenis. Além disso, todos os nematoides entomopatogênicos testados na concentração de 5.000 JI por vaso reduzem o número de galhas, massa de ovos, nematoides totais e fator de reprodução de *M. enterolobii* em casa de vegetação. Porém, *S. feltiae* em baixa concentração (100 JI por vaso) se destaca por proporcionar redução em todos os parâmetros avaliados.

Esses resultados são de grande relevância e promissores no manejo de *M. enterolobii*. Sendo assim, estudos adicionais devem ser realizados para adequação da metodologia necessária para aplicação (métodos, dosagens, época) dos NEPs em áreas maiores.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, v. 74, n.1, p. 35-47, ago. 2000.
- AKHURST, R.; BOEMARE, N. E. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990. p. 75–87.
- ARAUJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 5, p. 1558-1561, ago. 2009.
- BIRD, A. F.; BIRD, J. Observations on the use of insectparasitic nematodes as a means of biological control on root-knot nematodes. **Journal of Parasitology**, v. 16, n. 5, p. 511-516, out. 1986.
- BURMAN, M. *Neoplectana carpocapsae*: a toxin production by axenic insect parasitic nematodes. **Nematologica**, v. 28, n.1, p. 62–70, 1982.
- CATTELAN, L. V. **Aspectos anatômicos, citogenéticos e palinológicos de espécies de Solanum**. 2008. 30f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- CHARCHAR, J. M. **Meloigogyne em hortaliças**. In: Congresso Internacional de Nematologia Tropical, XXVII, Rio Quente. Resumos, 1995. p. 149-153.
- CHIAMOLERA, F. M. et al. Suscetibilidade de culturas de inverno a *Pratylenchus brachyurus* e atividade sobre a população do nematoide na cultura do milho. **Nematropica**, v. 42, n. 2, p. 267-275, dez. 2012.
- COIMBRA, J. L.; CAMPOS V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n.3, p. 232-238, mai./jun. 2005.
- DIAS, W. P. et al. **Nematoides em soja**: identificação e controle. Embrapa Soja. Circular Técnica, 2010.
- ESPINOZA, W, et al. **Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco**. Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco, Brasília, DF (Brasil) IICA, Brasília, DF (Brasil), 1991.
- GANJI, S.; WUBBEN, M. J.; JENKINS, J. N. Two simple methods for the collection of individual life stages of reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. **Journal of nematology**, v. 45, n.2, p. 87-91, jun. 2013.
- GARDIANO, C. G. et al. Avaliação de genótipos de aveia ao parasitismo de *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raça 3. **Nematropica**, v. 42, n.1, p. 80-83, jun. 2012.

GAUGLER, R. et al. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 17, n. 1, p. 100-109, jan. 2000.

GOUGE, D. H. et al. Effects of steinernematids on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Annals of Applied Biology**, v. 124, p. 134–135, 1994.

GREWAL, P. S.; LEWIS, E. E.; VENKATACHARI, S. Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. **Nematology**, v. 1, n.7, p. 735–743, 1999.

GREWAL, P. S. et al. Suppression of plant-parasitic nematode populations in turfgrass by application of entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 7, v.3, p. 393–399, jun. 1997.

HAEGEMAN, A. et al. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, v. 492, p. 19-31, jan. 2012.

HU, K.; LI, J.; WEBSTER, J. M. Mortality of plant-parasitic nematodes caused by bacterial (*Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus luminescens*) culture media. **Journal of Nematology**, v. 7, p. 502–503, 1995.

ISHIBASHI, N.; CHOI, D-R. Biological control of soil pests by mixed application of entomopathogenic and fungivorous nematodes. **Journal of Nematology**, v. 23, n. 2, p. 175–181, abr. 1991.

ISHIBASHI, N.; KONDO, E. *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: Persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. **Journal of Nematology**, v. 18, n.3, p. 310-316, jul. 1986.

JASMER, D. P.; GOVERSE, A.; SMANT, G. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. **Annual review of phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 245-270, jul. 2003.

JONES, M. G. K.; FOSU-NYARKO J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. **Annals of applied biology**, v. 164, n. 2, p. 163-181, fev. 2014.

KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual review of phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 423-441, set. 2000.

KORAYEM, A. M. et al. Plant-parasitic nematodes associated with different plants grown in newly reclaimed area in north west Egypt. **Egyptian Journal of Agronomatology**, v. 14, n. 1, p. 127- 136, ago. 2015.

LEAL-BERTIOLI, S. C. et al. Genetic mapping of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis stenoperma*: a new source of nematode resistance for peanut. **Genes Genomes Genetics**, v. 6, n. 2, p. 377-390, fev. 2016.

LEWIS, E. E.; GREWAL, P. S. Interactions with plantparasitic nematodes. In: GREWAL, P. S.; EHLERS, R. U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. **Nematodes as biocontrol agents**. New York: CABI, 2005. p. 349-362.

MACHADO, V. et al. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 165-182, 2012.

MIZ, R. B. Estudo filogenético das espécies da seção torva do gênero *Solanum* L. (Solanaceae) na região sul do Brasil. 2006. 168 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

NASCIMENTO, I. R. Cresce a demanda por mini tomate italiano. **Revista Campo e Negócios**, v. 70, n. 1, p. 42-43, mar. 2011.

PERRY, R. M.; MOENS, M. **Plant nematology**. Wallingford. CAB International. 2006. 463 p.

ROBINSON, A. F. et al. *Rotylenchulus species*: identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. **Nematropica**, v. 27, n. 2, p. 127-180, fev. 1997.

ROSA, J. M. O; WESTERICH, J. N; WILCKEN, S. R. Reprodução de *Meloidogyne javanica* em olerícolas e em plantas utilizadas na adubação verde. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 4, p. 826-835, out./dez. 2015.

SILVA, J. C. P. Aspectos gerais e manejo de *Meloidogyne enterolobii*. In: **Sanidade de Raízes** / NEFIT – Núcleo de estudos em Fitopatologia – 1ª edição – São Carlos, SP Suprema Grafia e Editora, 2014, p. 59-77.

SINGH, S. K.; HODDA, M.; ASH, G. J. Plant-parasitic nematodes of potencial phytosanitary importance, their main host and reported yield losses. **Eppo Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 334-374, jul. 2013.

VIEIRA, P. et al. The *Pratylenchus penetrans* transcriptome as a source for the development of alternative control strategies: Mining for putative genes involved in parasitism and evaluation of in planta RNAi. **PLoS one**, v. 10, n. 12, p. 146-151, dez. 2015.

WUYTS, N. et al. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistant banana (*Musa* spp.). **Plant Pathology**, v. 56, n. 5, p. 878-890, mar. 2007.

YANG, B. E.; EISENBACK, J. D. *Meloidogyne enterolobii* sp. (Meloidogynidae) a root-knot nematode parasiting pacara earpod tree in China. **Journal of Nematology**, v. 15, n. 3, p. 381-391, 1983.