

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CAMPUS DE FREDERICO WESTPHALEN – RS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA,
AGRICULTURA E AMBIENTE

Andressa Calderan Bisognin

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AGRESSIVIDADE DE
POPULAÇÕES DE *Pratylenchus* spp. PROVENIENTES DE CANA-DE-
AÇÚCAR E MANEJO DE FITONEMATOIDES NA CULTURA PELO
EMPREGO DE RIZOBACTÉRIAS**

Frederico Westphalen – RS
2017

Andressa Calderan Bisognin

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE
Pratylenchus spp. PROVENIENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR E MANEJO DE
FITONEMATOIDES NA CULTURA PELO EMPREGO DE RIZOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – FW, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**.

Orientadora Prof^ª Dr^ª Stela Maris Kulczynski

Frederico Westphalen – RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Calderan Bisognin, Andressa
Caracterização morfológica e agressividade de populações de *Pratylenchus* spp. provenientes de cana-de-açúcar e manejo de fitonematoides na cultura pelo emprego de rizobactérias / Andressa Calderan Bisognin.- 2017.
89 p.; 30 cm

Orientadora: Stela Maris Kulczynski
Coorientador: Cesar Bauer Gomes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura e Ambiente, RS, 2017

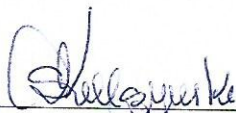
1. Rio Grande do Sul, levantamento, nematoides e controle biológico. I. Kulczynski, Stela Maris II. Bauer Gomes, Cesar III. Título.

Andressa Calderan Bisognin

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE
Pratylenchus spp. PROVENIENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR E MANEJO DE
FITONEMATOIDES NA CULTURA PELO EMPREGO DE RIZOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria, campus de
Frederico Westphalen (UFSM- FW, RS), como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Agronomia.

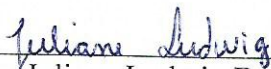
Aprovado em 31 de Março de 2017:



Stela Maris Kulczynski, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Cesar Bauer Gomes Dr. (EMBRAPA)
(coorientador)



Juliane Ludwig Dra. (UFFS)

DEDICATÓRIA

Á minha família e meu esposo, pelo amor e incentivo para seguir forte na caminhada, e por acreditarem em meus ideais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo o que conquistei em minha vida, por estar sempre guiando meu caminho, dando-me forças para seguir em frente na busca de meus objetivos.

Aos meus pais Valdomiro e Nilva Calderan e minhas irmãs Vanessa e Adriane pelo amor, incentivo e compreensão durante toda a minha caminhada.

Ao meu esposo Maicon Bisognin por estar ao meu lado em todos os momentos de minha formação profissional, me incentivando, compreendendo e me ajudando a construir um futuro brilhante.

À minha orientadora Professora Stela Maris Kulczynski, agradeço, o companheirismo, a compreensão e a disposição que sempre mostrou, no momento de repassar seus conhecimentos.

Às amigas e colegas de mestrado Vanessa, Marcia e Carol, pela grande amizade, pela ajuda prestada, pelos incentivos e por todos os momentos de descontração que tornaram a jornada mais alegre.

A amiga e colega Daniele de Brum pela amizade, companheirismo e auxílio desde os tempos da graduação até hoje.

Aos colegas de Laboratório de Fitopatologia da UFSM, Paulo Roberto Kuhn, Luthiano Moura, Douglas Gheller, Andrei Martins, Vanessa Alba, Dionei Muraro e Eduardo Ceolin pela grande ajuda prestada e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do mestrado pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA, Fernanda Cruz, Jaqueline Schafer, Israel Lima-Medina, Cristiano Bellé e Victor Hugo Casa Coila por todo auxílio prestado durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores da UFPel Danielle Barros e Jerônimo Vieira de Araújo Filho, pela disponibilidade e ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do laboratório de Virologia Vegetal da UFPel .

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Universidade Federal de Santa Maria pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado, pelo apoio e espaço concedido para o desenvolvimento das pesquisas.

Ao pesquisador e coorientador Dr. Cesar Bauer Gomes, pela orientação e pelo acompanhamento desta pesquisa.

Aos professores do Departamento de Ciências Agronômicas pela contribuição na minha formação

Em fim, a todos aqueles que mesmo não mencionados participaram de alguma forma na elaboração deste trabalho.

A todos vocês, **MUITO OBRIGADO.**

*“Nós somos do tamanho dos nossos sonhos, conquistamos na medida de nossa perseverança,
possuímos na medida que valorizamos e prosseguimos na medida de nossa fé”.*

(Antonio Tecco Jorge)

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE *Pratylenchus* spp. PROVENIENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR E MANEJO DE FITONEMATOIDES NA CULTURA PELO EMPREGO DE RIZOBACTÉRIAS

AUTORA: Andressa Calderan Bisognin
ORIENTADORA: Stela Maris Kulczynski

A cana-de-açúcar está entre as culturas mais afetadas pela presença de fitonematoides, sendo observadas grandes perdas em produtividade a cada ano. Tendo em vista este problema, teve-se por objetivo o presente trabalho, caracterizar as populações do nematoide das lesões *Pratylenchus* spp. provenientes de canaviais do litoral e serra gaúcha, bem como avaliar a agressividade de populações de *Pratylenchus* em dois genótipos de cana-de-açúcar e avaliar *in vitro* e *in vivo* o potencial de bactérias no biocontrole dos nematoides *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus zae* e promoção do crescimento da referida cultura. No levantamento foram obtidas 16 populações de *Pratylenchus* spp., as quais foram caracterizadas por meio de caracteres morfológicos e morfométricos, sendo *Pratylenchus zae* encontrados em 100% das amostras avaliadas e *P. brachyurus* associada a *P. zae* em apenas uma amostra coletada no município de Caxias do Sul. Posteriormente, avaliou-se em casa de vegetação a agressividade de quatro populações de *Pratylenchus* sendo três populações de *P. zae*, provenientes de Crissiumal, Pelotas e Caxias do Sul e uma população de *P. brachyurus* proveniente de Porto Xavier as quais foram inoculadas em dois genótipos de cana suscetíveis, a *P. zae*, sendo eles RB935581 e RB966928. Todas as populações se reproduziram em ambas as cultivares de cana-de-açúcar, apresentando $FR > 1$, demonstrando níveis de agressividade distintos, os quais influenciaram negativamente no desenvolvimento de alguns parâmetros de desenvolvimento de planta, sendo os mais afetados, o diâmetro do colmo e massa fresca de raiz. Para a avaliação do potencial das rizobactérias como promotoras de crescimento e agentes de supressão dos fitonematoides, foi primeiramente realizada uma seleção *in vitro* onde foram testados 48 isolados de bactérias provenientes da rizosfera de figueira e de folhelhos pirobetuminosos sendo avaliados quanto a sua capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção de crescimento e na intensidade de colonização radicular de cana-de-açúcar. A seguir, as rizobactérias pré-selecionadas foram avaliadas *in vitro* sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M.*

javanica e *in vivo* sobre o seu potencial nematicida e como promotoras de crescimento de mudas infectadas com *M. javanica* e *P. zae*. A maioria das bactérias selecionadas *in vitro* e *in vivo* demonstraram potencial como agentes de microbiolização de mudas de cana-de-açúcar, apresentando níveis de intensidade de colonização radicular distintos. As rizobactérias XT39 (*Micrococcus luteus*) e XT23 (*Micrococcus luteus*), isoladas de folhelhos pirobetuminosos, evidenciaram potencial promissor no biocontrole de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Rio Grande do Sul, levantamento, nematoides e controle biológico.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND AGGRESSIVENESS OF POPULATIONS OF *Pratylenchus* spp. FROM SUGAR CANE AND MANAGEMENT OF PHYTONEMATIDS IN CULTURE BY THE EMPLOYMENT OF RIZOBACTERIAS

AUTORA: Andressa Calderan Bisognin
ORIENTADORA: Stela Maris Kulczynski

Sugarcane is among the crops most affected by the presence of phytonematoids, with large losses in productivity observed each year. In view of this problem, the objective of this work was to characterize the nematode populations of the *Pratylenchus* spp. and evaluate the aggressiveness of *Pratylenchus* populations in two sugarcane genotypes and to evaluate *in vitro* and *in vivo* the potential of bacteria in the biocontrol of the nematodes *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus zaeae* and promotion of the Growth of this culture In the survey 16 *Pratylenchus* spp. Populations were obtained, which were characterized by morphological and morphometric characters, with *Pratylenchus zaeae* being found in 100% of the evaluated samples and *P. brachyurus* associated to *P. zaeae* in only one sample Collected in the municipality of Caxias do Sul. The aggressiveness of four *Pratylenchus* populations was evaluated in the greenhouse, with three populations of *P.zaeae*, from Crissiumal, Pelotas and Caxias do Sul, and a population of *P. brachyurus* from Porto Xavier, which were inoculated in two susceptible cane genotypes, *P. zaeae*, being RB9 35581 and RB966928. All populations reproduced in both sugarcane cultivars, presenting RF> 1, showing distinct levels of aggressiveness, which negatively influenced the development of some parameters of plant development, being the most affected, the diameter of the stem And fresh root dough. In order to evaluate the potential of rhizobacteria as growth promoters and phytonuthoid suppression agents, an *in vitro* selection was carried out in which 48 isolates of bacteria from the fig tree rhizosphere and pyrobetum shales were tested and evaluated for their production capacity Compounds related to biocontrol and / or growth promotion and the intensity of root colonization of sugarcane. Preselected rhizobacteria were then evaluated *in vitro* on hatching and mortality of second stage (J2) juveniles of *M. javanica* and *in vivo* on their nematicidal potential and as growth promoters of *M. javanica*-infected seedlings and *P. zaeae*. Most of the bacteria selected *in vitro* and *in vivo* demonstrated potential as microbiolization agents of sugarcane seedlings, presenting different levels of root colonization intensity. The

rhizobacteria XT39 (*Micrococcus luteus*) and XT23 (*Micrococcus luteus*), isolated from pyrobetumine shales, showed a promising potential in the biocontrol of *Meloidogyne javanica* and in the promotion of growth of sugarcane plants.

Key words: Rio Grande do Sul, survey, nematodes, biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1 – Mapa demonstrativo dos municípios abrangidos e dos pontos de coletas amostras de solo e raízes para avaliação da distribuição de espécies e nível populacional do nematoide das lesões nos canaviais do Rio Grande do Sul. Frederico Westphalen/RS, 2017.....28

Figura 2 – Fotomicrografia de *Pratylenchus zae* em microscópio óptico. A: parte posterior do corpo posição da vulva (100x), B: visão geral do corpo (20x), C: parte anterior de corpo região labial (100x). Frederico Westphalen/RS 2017.....34

Figura 3 – Fotomicrografia de *Pratylenchus brachyurus* em microscópio óptico. A: parte posterior do corpo posição da vulva (100x), B: Visão geral do corpo (20x), C: parte anterior de corpo região labial (100x). Frederico Westphalen/RS 2017.....35

Capítulo 3

Figura 1 – Produção de plântulas de cana-de-açúcar RB008347 a partir da cultura de tecido: meristema apical (A), meristema apical com algumas semanas (B) e plântulas prontas para a microbiolização (C).....63

Figura 2 – Colonização radicular de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB008347 microbiolizadas com bactérias, aos oito dias após a microbiolização. Frederico Westphalen/RS, 2017.....73

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Níveis populacionais de *Pratylenchus* sp. em raízes e solo de áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. Frederico Westphalen/RS, 2017.....30

Tabela 2 - Valores morfométricos de espécimes do gênero *Pratylenchus* coletados em canaviais de diferentes municípios do litoral e serra gaúcha obtidos a partir da mensuração de 20 fêmeas por amostra. Frederico Westphalen, 2017.....31

Capítulo 2

Tabela 1 – Fator de reprodução de nematoides do gênero *Pratylenchus* inoculados em cana-de-açúcar. Frederico Westphalen /RS, 2017.....47

Tabela 2 – Influência das populações de *Pratylenchus* sobre as variáveis vegetativas de cana-de-açúcar: altura, diâmetro do colmo (DC), massa fresca de raiz (MFR), número de perfilho (Nº perfilho) e massa fresca de parte aérea (MFPA). Frederico Westphalen/RS 2017.....48

Tabela 3 – Parâmetros vegetativos de cultivares de cana-de-açúcar submetidas à inoculação com diferentes populações de *Pratylenchus zae* e *P.brachyurus*. Frederico Westphalen/RS, 2017.....49

Capítulo 3

Tabela 1 –Identificação de bactérias isoladas de rochas de folhelhos pirobetuminosos (XT e P) e da rizosfera de figueiras (F), e sua capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole.....61

Tabela 2 – Caracterização molecular de isolados bacterianos provenientes de folhelhos pirobetuminosos (XT, P), rizosfera de figueira (F, FC) e sua capacidade de produzir compostos relacionados à promoção do crescimento de plantas.....69

Tabela 3 – Intensidade de colonização radicular *in vitro* de plântulas de cana-de-açúcar RB00834 por isolados bacterianos de folhelhos pirobetuminosos (XT, P) e rizosfera de figueira (F, FC) aos oito dias após a microbiolização.....71

Tabela 4 – Potencial de isolados bacterianos na promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar quanto aos parâmetros de altura, massa fresca de parte aérea (MFPA), peso de raiz (P RZ), clorofila A (Clor A), Clorofila B (Clor B) e clorofila total (Clor T).....74

Tabela 5– Percentagem da inibição da eclosão e mortalidade <i>in vitro</i> de juvenis de 2º estágio de <i>M. javanica</i> submetidos ao tratamento de seis isolados bacterianos.....	76
Tabela 6 – Efeito das bactérias no crescimento de plantas de cana-de-açúcar e sobre o nematoide das galhas <i>M. javanica</i> quanto aos parâmetros de altura, diâmetro do colmo (DC), massa fresca de parte aérea (MFPA), número de galhas (NG) e fator de reprodução (FR).....	78
Tabela 7 – Cana-de-açúcar microbiolizada com bactérias e inoculadas com nematoide <i>P. zaeae</i> . Primeira avaliação aos trinta dias, quanto os parâmetros de número de perfilho, altura, clorofila A (Cloro A), clorofila B (Cloro B) e clorofila total (CloroT).....	80

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPITULO I: CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE <i>Pratylenchus</i> spp. PROVENIENTES DE CANAVIAIS DAS REGIÕES SERRANA E LITORÂNEA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.....	24
1- INTRODUÇÃO	24
2- MATERIAL E MÉTODOS	27
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4- CONCLUSÃO	37
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPITULO II: AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE <i>Pratylenchus zae</i> E <i>P. brachyurus</i> EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.	43
1- INTRODUÇÃO	43
2- MATERIAL E METODOS	45
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4- CONCLUSÃO	52
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CAPITULO III: POTENCIAL DE RIZOBACTÉRIAS NA COLONIZAÇÃO RIZOSFÉRICA, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E MANEJO DE FITONEMATOIDES NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	57
1- INTRODUÇÃO	57
2- MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1- Origem, identificação, caracterização e manutenção dos isolados bacterianos.	60
2.2- Avaliação de isolados bacterianos quanto a capacidade de solubilização de compostos relacionados à promoção de crescimento de plantas.	61
2.2.1- Solubilização de fosfato	62
2.2.2- Solubilização de potássio	62
2.3- Avaliação <i>in vitro</i> da colonização do sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar microbiolizadas com bactérias.....	62
2.4- Potencial de isolados bacterianos selecionados <i>in vitro</i> na produção de mudas de cana-de-açúcar.....	64

2.5- Efeito nematicida e ovicida <i>in vitro</i> dos isolados de rizobactérias sobre juvenis de segundo estágio e ovos de <i>M. javanica</i>	65
2.6- Potencial de rizobactérias na promoção do crescimento e no biocontrole de <i>Meloidogyne javanica</i> em cana-de-açúcar.....	66
2.7- Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar infectadas com o <i>Pratylenchus zae</i>	66
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1 Identificação e caracterização das rizobactérias e avaliação da capacidade de solubilização	67
3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da colonização do sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar microbiolizadas com bactérias	71
3.3 Potencial de isolados bacterianos selecionados <i>in vitro</i> na produção de mudas de cana-de-açúcar	73
3.4 Efeito nematicida e ovicida <i>in vitro</i> dos isolados de rizobactérias sobre juvenis de segundo estágio e ovos de <i>M. javanica</i>	75
3.5 Potencial de rizobactérias na promoção do crescimento e no biocontrole de <i>Meloidogyne javanica</i> em cana-de-açúcar.....	77
3.6 Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar infectadas com o <i>Pratylenchus zae</i>	79
4- CONCLUSÃO	82
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1- INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) possui grande importância no agronegócio mundial, estando amplamente difundida em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo cultivada em longas extensões principalmente em latitudes entre 35°N e 35°S (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Estima-se que a mesma seja cultivada em 90 países, chegando a cerca de vinte milhões de hectares, tendo o açúcar e o álcool seus principais derivados (BALDANI et al., 2002). O Brasil é o maior produtor mundial, tendo produzido 665,6 milhões de toneladas na safra de 2015/2016, em uma área plantada em torno de 8.654,5 mil hectares, sendo o estado de São Paulo, maior produtor do país, responsável por uma produção de 367,6 milhões de toneladas, o que correspondendo a 55% da produção nacional (CONAB, 2016).

O Rio Grande do Sul produziu 61,2 mil de toneladas, sendo a área cultivada de 1,2 mil ha (CONAB, 2016), o que corresponde a 9,2% da produção nacional. Mesmo que a produção do estado não seja tão expressiva em proporção nacional, apresenta grande significância a nível regional, possuindo grande importância socioeconômica, pois a grande maioria das áreas de cultivo encontram-se localizadas em áreas de produção familiar, sendo destinada principalmente para a produção de açúcar mascavo, melado, rapadura e aguardente, além de ser utilizada in natura para a alimentação do rebanho bovino, principalmente no inverno (BELLÉ, 2014).

Referente à questão fitossanitária, as maiores perdas relacionadas aos canaviais de maneira geral são causadas por *Ustilago scitaminea* causador do carvão, raquitismo da soqueira causada pela bactéria *Leifsonia xyli sbsp xyli*, escaldadura causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson e ferrugem causada por *Puccinia melanocephala*, além de danos severos causados por insetos-pragas a exemplo da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), bem como os fitonematoides, os quais são de difícil controle (AMORIM et al., 2016; GALLO et al., 2002).

Com relação aos fitonematoides, os principais causadores de danos a cana-de-açúcar pertencem aos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* (MOURA et al., 2000), cuja carência de informações relacionadas ao manejo da cultura, juntamente com a presença destes patógenos são fatores que acarretam perdas elevadas nos canaviais, além de afetarem a qualidade da sacarose produzida (SUNDARARAJ, MEHTA, 1994; BARROS et al., 2005; MOURA, OLIVEIRA, 2009).

A sintomatologia observada a campo nos canaviais decorrentes do ataque de fitonematoides são “reboleiras” de plantas menores, cloróticas e apresentando murcha nas horas mais quentes do dia. Essa sintomatologia ocorre devido ao parasitismo dos fitonematoides, os quais debilitam o sistema radicular, onde as raízes tornam-se pobres em radicelas e incapazes de absorver a água e os nutrientes necessários ao adequado desenvolvimento das plantas (DINARDO-MIRANDA, 2005).

A presença de fitonematoides nas áreas de cultivo além de reduzirem a produção inviabilizam a implantação de novos canaviais dependendo da população da praga ocorrente no local. De acordo com Sasser e Freckman (1987) as nematoses são responsáveis por 15,3% de perdas mundiais à cana-de-açúcar. Dessa forma, tornam-se necessárias maiores pesquisas no sentido de desenvolver cultivares resistentes, bem como técnicas de manejo e controle, pois uma vez presentes na área os nematoides são praticamente impossíveis de erradicar, devido as suas características de sobrevivência, como a polifagia que os permite alimentar-se de uma elevada gama de hospedeiros (DINARDO-MIRANDA et al., 2003; DINARDO-MIRANDA et al., 2008).

No Rio Grande do Sul existem poucos estudos sobre registros da ocorrência do nematoide das lesões infectando a cultura da cana-de-açúcar. Devido a isso, pouco se sabe a respeito da reação de agressividade das diferentes populações de *Pratylenchus* encontrada no estado. Um dos poucos trabalhos desenvolvidos foi o de Bellé et al. (2017), o qual realizaram levantamento e testaram a reação de genótipos de cana-de-açúcar a *P. zae*, constatando a presença do nematoide na grande maioria das amostras.

Para a elaboração de estratégias de manejo e práticas de controle é fundamental a correta identificação da espécie ocorrente na área. A identificação dos gêneros pode ser realizada morfológicamente, porém, a caracterização a nível de espécie, importante na recomendação correta do controle, é realizada de forma diferenciada de acordo com o gênero de nematoide em questão. Para a identificação das espécies de nematoides pertencentes ao gênero *Pratylenchus* uma das formas mais utilizadas é a observação de caracteres morfológicos e morfométricos, os quais são feitos por meio de auxílio de microscópio óptico de varredura, conjuntamente com chave taxonômica (CASTILLO, VOVLAS, 2005). Técnicas como a análise da biologia molecular da região ITS do rDNA, também podem ser utilizadas (VRAIN et al., 1992; SUBBOTIN et al., 1999; WAEYENBERGE et al., 2000).

Vários métodos de controle têm sido pesquisados visando diminuir as populações de fitonematoides na cultura da cana-de-açúcar a níveis abaixo do limiar de dano econômico, visando uma integração entre as técnicas disponíveis, para tornar o processo produtivo mais

racional, eficiente e econômico (NOVARETTI et al., 1998). As técnicas mais recomendadas são nematicidas, rotação de culturas, variedades resistentes ou tolerantes, controle biológico e outras práticas culturais (DINARDO-MIRANDA et al., 1995; BARROS et al., 2000).

O uso de variedades resistentes ou tolerantes, é o método mais desejado, pois sua implantação é mais simples e econômica, além de não apresentar problemas com resíduos indesejáveis. No entanto, são raras as variedades atualmente em cultivos, resistentes ou tolerantes a pelo menos uma das espécies de nematoide de importância econômica, e, quando disponíveis apresentam interação específica para os patógenos, o que dificulta o controle em nível de campo, pois em muitos casos ocorre mais de uma espécie de patógeno na mesma área (DINARDO-MIRANDA, 2005).

As limitações do uso da rotação de cultura são devido à ampla gama de hospedeiros destes patógenos, incluindo plantas daninhas. A utilização de nematicidas possui como inconvenientes, o alto custo, presença de resíduos nos produtos colhidos, contaminação humana e de fontes de água e destruição da microbiota do solo, surgimento de populações resistentes, e ineficiência para algumas espécies (VILLAS BOAS et al., 2002; VAZ et al., 2011). Na busca por uma alternativa viável e ecologicamente sustentável de minimizar as perdas causadas pelos nematoides, destaca-se o controle biológico que reduz a população dos mesmos pela ação de organismos antagonistas, como fungos e bactérias (DINARDO-MIRANDA, 2005; ALVES et al., 2011; MACHADO et al., 2012).

Como potenciais agentes de controle biológico de nematoides, está uma ampla gama de bactérias da rizosfera com efeito nematicida e promotor de crescimento (STURZ, NOWAK, 2000; TIAN et al., 2007; MACHADO et al., 2012). Essas bactérias, conhecidas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) e caracterizadas por colonizarem as raízes das plantas, tem potencial na promoção do desenvolvimento das plantas e no controle biológico de nematoides (SCHROTH, HANCOCK, 1982; STIRLING, 1991; SIDDIQUI, MAHMOOD, 1999; VAZ et al., 2011).

Dentre os mecanismos de ação das rizobactérias na promoção do crescimento das plantas está a captação de nutrientes do solo solubilização de fosfatos (VESSEY, 2003; ROMEIRO, 2007), e produção de fitormônios, obtendo-se plantas mais fortes, menos suscetíveis a enfermidades. E o seu efeito nematicida pode ser devido a sua atuação diretamente sobre os nematoides por meio de antibióticos e toxinas que inibem a eclosão e a motilidade dos juvenis (STIRLING, 1991; OKA et al., 1993), reduzindo a invasão dos nematoides nas raízes das plantas. Além disso, podem modificar os exsudados radiculares, fazendo com que os mesmos não sejam reconhecidos pelos nematoides e, conseqüentemente

inibindo a infecção de raízes (RAMAMOORTHY et al., 2001; HIGAKI, ARAÚJO, 2012), bem como a indução resistência (CHEN et al., 1995; KLOEPPER et al., 2004).

Considerando que o manejo de fitonematoides em áreas infestadas é complexo, foram realizados estudos visando um maior conhecimento sobre o nematoide das lesões e as técnicas de controle disponíveis para auxiliar no estabelecimento de estratégias de controle. Assim, o presente trabalho constou de três capítulos que foram organizados na seguinte sequência: no primeiro capítulo foi realizado o levantamento e a caracterização de populações do nematoide das lesões em canaviais do litoral norte e serra do Rio Grande do Sul, no segundo, avaliou-se a reação de agressividade de populações de *Pratylenchus* spp. a genótipos de cana-de-açúcar, e, no terceiro, avaliou-se o potencial de rizobactérias como promotoras de crescimento e biocontroladoras de fitonematoides em cana-de-açúcar.

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. C. S.; SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. M.; JESUS, F. G.; ALMEIDA, E. J.; THULER, R. T. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaei*. **Arquivo do Instituto Biológico** São Paulo v.78, n.4, p.557-564, out./dez., 2011.
- AMORIM, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.). Manual de Fitopatologia. **Doenças de Plantas cultivadas**. Ceres; São Paulo, p.219-231. 2016.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v.29, p.417-423, 2002.
- BARROS, A. C. B., MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Aplicação de terbufós no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zaei* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 – Efeitos na cana planta. **Nematologia Brasileira**, v. 24, p. 73-78, 2000.
- BARROS, A. C .B., MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Estudo de interação variedade-nematicida em cana-de-açúcar em solo naturalmente infestado por *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaei*. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n.1, p.39-46, 2005.
- BELLÉ, C. **Fitonematoides na cultura da cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul: levantamento, caracterização e reação de genótipos a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus zaei***. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Agronomia, Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Frederico Westphalen, 2014.
- BELLÉ, C.; KULCZYNSKI, S. M.; KUHN, P. R.; DONINI, L. P.; GOMES, C. B. Reaction of sugarcane genotypes to parasitism of *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus zaei*. **Revista Caatinga**, v. 30, n.2, p. 530-535, abr.-jun, 2017.
- CASTILLO, P.; VOVLAS, N. Bionomics and identification of the Genus *Rotylenchus* (Nematoda: Hoplolaimidae). **Leiden, Netherlands Brill Academic Publishers**, 377p. 2005.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; COUTO DE ABREU, H. M.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; LEE-BURNQUIST, W.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; DE OLIVEIRA-FIGUEIRA, A. V.; DE SOUSA-FILGUEIRAS, T.; GROSSI-DE-SÁ, M. DE F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; GUIMARÃES DE ANDRADE, M. L.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; DE CASTRO REINACH, F.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; DE CASTRO SILVA FILHO, M.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 62– 89, 2011.

CHEN, Y.; MEJ, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: CHEN, Z. X.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Effects of soil treatments on the survival of soil microorganisms. **Journal of Nematology**, v.27, n.4, p.661-663, 1995.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, quarto levantamento, abril/2016.** Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_p_ortugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf> Acessado em 10 de fev. 2017.

DINARDO-MIRANDA, L.L., NOVATETTI, W.R.T.; MORELLI, J.L.; NELLI, E.J. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em relação a *Meloidogyne javanica* em condições de campo. **Nematologia Brasileira**, v. 19 n. 2, p. 60-66, 1995.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Manejo de fitonematóides em cana-de-açúcar. **Jornal Cana**. v.5, p. 64-67, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, M. A.; COELHO, A. L.; GARCIA, V.; MENEGATTI, C. C. Efeito da torta de filtro sobre as infestações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, v. 27, p. 61-67, 2003.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia** v. 67, p- 179-190, 2008.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

HIGAKI, W. A.; ARAUJO, F. F. *Bacillus subtilis* e abamectina no controle de nematoides e alterações fisiológicas em algodoeiro cultivado em solos naturalmente infestados. **Nematropica**, 295-303. 2012.

KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M. ; ZHANG, S. Induziu resistência sistêmica e promoção do crescimento vegetal por *Bacillus* spp **Fitopatologia**, v.94, n.11, p.1259-66, 2004.

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis** 165-182, Junho 2012.

MOURA, R.M., E.M.R. PEDROSA, S.R.V.L. MARANHÃO, M.E.A. MACEDO, A.M. MOURA, E.G. SILVA; R.F. LIMA. Ocorrência dos nematóides *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.1, p.101-103, 2000.

MOURA, R.M; OLIVEIRA, I.S.O. Controle populacional de *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar, em dois ambientes edáficos no nordeste do Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 33, p. 67-73, 2009.

NOVARETTI, W. R. T., A. MONTEIRO, L. C. B. Controle químico de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar com carbofuran e terbufós. **Nematologia Brasileira**, v.22,p.60-73, 1998.

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

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RGGUCHANDER, T.; RACKASAM, V. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protec.**, 2001.

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas - Fundamentos**. Viçosa Ed UFV, 269p, 2007.

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

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376-1381, 1982.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Role of rhizobacteria in the management of plant-parasitic nematodes: A review: **Bioresource Technology**, v.69, p.167-179, 1999.

STIRLING, G.R. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Wallingford, UK, CAB International**, 282 pp, 1991.

STURZ, A.V. & NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Appl. Soil Ecol.**, 15:183- 190, 2000.

SUNDARARAJ, P.; MEHTA, U. K. Influence of the lesion nematode, *Pratylenchus zae*, on yield and quality characters of two cultivars of sugarcane. **Nematologia Mediterranea**, v. 22, p. 65-67, 1994.

SUBBOTIN, S.A.; WAEYENBERGE, L.; MALOKANOVA, I.A.; MOENS, M. Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometrics and rDNA-RFLPs. **Nematology**, v. 1, p. 195-207, 1999.

TIAN, B. Y.; YANG, J. K.; LIAN, L. H.; WANG, C. Y.; ZHANG, K. Q. Role of neutral protease from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.372-380, 2007.

VAZ, M. V.; CANEDO, E. J.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A.; Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**. , n. 8, vol. 1, 2011.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.

VILAS BOAS, L. C.; TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; SILVA NETO, S. P.; ROCHA, H. S. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 690- 693, 2002

VRAIN, T.C.; WAKARCHUK, D.A.; LÈVESQUE, A.C.; HAMILTON, R.I. Intraspecific rDNA restriction fragment polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 15, p. 563-573, 1992.

WAEYENBERGE, L.; RYSS, A.; MOENS, M.; PINOCHET, J.; VRAIN, T.C. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. **Nematology**, v. 2, p. 135-142, 2000.

CAPITULO I: CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Pratylenchus* spp. PROVENIENTES DE CANAVIAIS DAS REGIÕES SERRANA E LITORÂNEA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.

1- INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) pertence à família Poaceae e originária do Sudeste da Ásia, caracteriza-se por ser de hábito perene, e se desenvolvendo preferencialmente em clima tropical e subtropical. Desta forma, o Brasil por apresentar clima favorável para seu cultivo na maior parte do território, tornou-se seu principal produtor (SUBIRÓS-RUIZ, 1995; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Nos últimos 30 anos a cultura canieira vem ganhando espaço e gerando grandes expectativas, devido ao seu potencial para a produção de energia sustentável (ARRUDA, 2011), bem como por apresentar grande versatilidade de produtos obtidos a partir da sua matéria prima.

O cultivo da cana-de-açúcar apesar de suas áreas estarem em ascensão devido a grande demanda de seus produtos vem sofrendo limitações em sua produção, isso sendo atribuído principalmente em função das doenças que acometem os canaviais. Dentre estas enfermidades, pode-se destacar o carvão (*Ustilago scitaminea*), raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* sbsp *xyli*), escaldadura (*Xanthomonas albilineans*), a ferrugem (*Puccinia melanocephala*) e as nematoses, as quais causam grandes perdas na produtividade e redução da vida do canavial, visto que os nematoides tem sua multiplicação e danos facilitados devido ao longo ciclo da cultura (AMORIM et al., 2016; CASTILLO, VOVLAS, 2007).

Os gêneros de nematoides com maior ocorrência são *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, estando os mesmos amplamente disseminados em todo o país, e relacionados à redução na produção. As espécies que afetam os canaviais variam de acordo com a região de implantação, porém, sabe-se que as espécies de maior ocorrência na cultura, no Brasil, são *Pratylenchus zae* Graham, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood (BARBOSA, 2008). Tratando-se dos nematoides das lesões radiculares a espécie *P. zae* é a espécie que possui maior expressão estando distribuída amplamente em canaviais do mundo inteiro, (CADET, SPAULL, 2005; DUNCAN, MOENS, 2006) bem como nos canaviais brasileiros.

Dinardo-Miranda (2005) afirma que as perdas causadas pelos nematoides das lesões radiculares podem variar ente 20% a 30% de redução na produtividade em cana planta, acrescentando-se a isso os danos em cana soca, os quais podem chegar a 20 t/há/corte, assim reduzindo drasticamente a vida útil do canavial. Além disso, os prejuízos podendo variar

dependendo das condições de solo, população e espécie de nematoide presente na área e das características genéticas da cultivar, embora tais dados se refiram principalmente aos danos causados por *P. zaeae*, devido ao fato da patogenicidade de *P. brachyurus* na cultura da cana-de-açúcar não esta totalmente esclarecida.

A realização de levantamentos populacionais nas diferentes regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil demonstra a importância do conhecimento das espécies ocorrentes em determinado local, a fim de realizar corretamente o manejo destes fitoparasitas, uma vez que considerando as principais espécies causadoras de danos, sabe-se que as mesmas apresentam elevada frequência e densidades populacionais, podendo-se afirmar, de acordo com os dados já conhecidos, que cerca de 70% das áreas cultivadas abrigam, uma ou mais espécies de importância (NOVARETTI, TÉRAN, 1983; NOVARETTI et al., 1984; MOURA et al., 1990; NOVARETTI, 1997; MOURA et al., 1999; MOURA et al., 2000; CHAVES et al., 2002; SEVERINO, 2007; SEVERINO et al., 2010; BELLÉ, 2014).

No estado de São Paulo, Dinardo-Miranda (2005) avaliou a ocorrência de nematoides em canaviais através da análise de amostras que foram recebidas no laboratório de análises agrícolas DMLAB, observou que em 35% das amostras apresentavam a ocorrência de *P. brachyurus*. No entanto apesar do aumento da presença deste nematoide nas lavouras, ainda não se tem estudos conclusivos sobre sua patogenicidade na cultura, contrariamente aos de *P. zaeae*, onde sabe-se que as perdas podem ser muito expressivas quando se pensa em viabilidade econômica da atividade. Severino et al. (2010) realizando levantamento no noroeste do estado do Paraná onde coletou um total de 74 amostras, constatou que o gênero mais frequente nos canaviais foi *Meloidogyne* presente em 96,8% das amostras, seguido de *Pratylenchus* com 85,3%. Já no estado do Rio Grande do Sul em levantamento realizado por Bellé (2014), tendo coletado 134 amostras, menciona que os principais nematóides encontrados parasitando a cultura foram *M. javanica*, *M. incognita*, *P. zaeae* e *P. brachyurus*.

A presença de nematoides fitoparasitas dos gêneros *Pratylenchus* e *Meloidogyne* foram também verificados em outras culturas no Rio Grande do Sul. Na cultura da videira, a presença dos mesmos foi observada por Somavilla (2011) e Kuhn (2015) em amostras coletas na serra gaúcha. Do mesmo modo, em batata, Lima-Medina (2013), identificou a presença dos mesmos tanto em amostras do RS quanto em Santa Catarina e Paraná. Deuner et al. (2015) e Santos et al. (2014) também verificaram a presença de ambos os gêneros em soja, destacando ainda mais a importância do monitoramento das áreas de plantio para a realização de manejo adequado.

Os danos causados pelos nematoides podem ser observados no sistema radicular da cana-de-açúcar, e, que no caso do gênero *Pratylenchus*, o mesmo caracteriza-se por causar necrose nas raízes que iniciam por lesões avermelhadas e após tornam-se escurecidas, diminuindo a quantidade de raízes e radículas. Essa sintomatologia é ocasionada pela presença dos nematoides no interior das raízes, que devido ao hábito alimentar, classificado como um endoparasita migrador, reduz a absorção de água e nutrientes pela planta, acarretando perdas de produtividade reduzindo a longevidade do cultivo. A observação a campo dos sintomas reflexo da injúria causada nas raízes é dada pela ocorrência de “reboleiras”, onde é possível identificar plantas que apresentam tamanho menor em relação às demais e folhas amareladas devido à deficiência na absorção de água e nutrientes (DINARDO-MIRANDA, 2005; SEVERINO, 2007).

A elevada polifagia das espécies mais ocorrentes nos canaviais, *M. javanica*, *M. incongnita*, *P. zaeae*, *P. brachyurus* e a interação com outros organismos patogênicos do solo, tornam os fitonematoides pragas de grande importância, responsáveis pela limitação da produtividade agrícola, causando reduções de aproximadamente 157 bilhões de dólares anuais nas diferentes culturas (SASSER, FRECKMAN, 1987; ABAD et al., 2008). Além disso, os prejuízos causados pelos mesmos, não se restringem a redução da produtividade, podendo também, inviabilizar a implantação de novos cultivos em áreas altamente infestadas, em função de sua capacidade de alimentar-se de diversos hospedeiros tornando, assim, antieconômica a exploração de certas culturas (DINARDO-MIRANDA et al., 2003; DINARDO-MIRANDA et al., 2008).

Para que se possam minimizar as perdas ocasionadas pelo ataque desses patógenos é necessário que a diagnose e a identificação das espécies que estão atacando o canavial sejam precisas, pois tal identificação vai influenciar principalmente nas plantas que serão utilizadas na rotação de cultura afim de diminuir a população dos nematoides na área e para a implantação posteriormente de cultivares de cana mais tolerantes.

A identificação das espécies do gênero *Pratylenchus*, é realizada de forma clássica, através de técnicas de mensuração e observação de características morfológicas e morfométricas, sendo as mesmas realizadas com o auxílio de microscópio óptico de varredura, conjuntamente com chave taxonômica (CASTILLO, VOVLAS, 2005). A identificação também pode ser realizada através de biologia molecular, mediante extração de DNA, sendo essa análise concentrada na região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossômico (rDNA) a qual tem recebido especial atenção (VRAIN et al., 1992; FERRIS; FERRIS; FAGHIHI, 1993; WENDT; VRAIN; WEBSTER, 1993; IBRAHIM et al., 1994;

JOYCE et al., 1994; ZIJLSTRA et al., 1995; ORUI, 1996; CHERRY et al., 1997; POWERS et al., 1997; SUBBOTIN et al., 1999; WAEYENBERGE et al., 2000). A região ITS, localizada entre os genes 18S e 28S, é um versátil marcador molecular, utilizado para analisar espécies, populações e comunidades ecológicas de nematóides (VRAIN; McNAMARA, 1994).

Devido à ampla disseminação geográfica e a ocorrência de diferentes espécies nos canaviais, os levantamentos populacionais e a identificação precisa da espécie que está causando danos é de suma importância para determinação de seu manejo (TIHOHOD, 2000). Apesar de se ter conhecimento da distribuição de espécies de *Pratylenchus* no noroeste gaúcho, pouco se sabe sobre a ocorrência do gênero em canaviais de outras regiões do RS. Sendo assim o objetivo desse estudo foi realizar a caracterização das populações de *Pratylenchus* spp. ocorrentes em canaviais nas regiões do litoral norte e serra do Rio Grande do Sul, através da análise morfométrica.

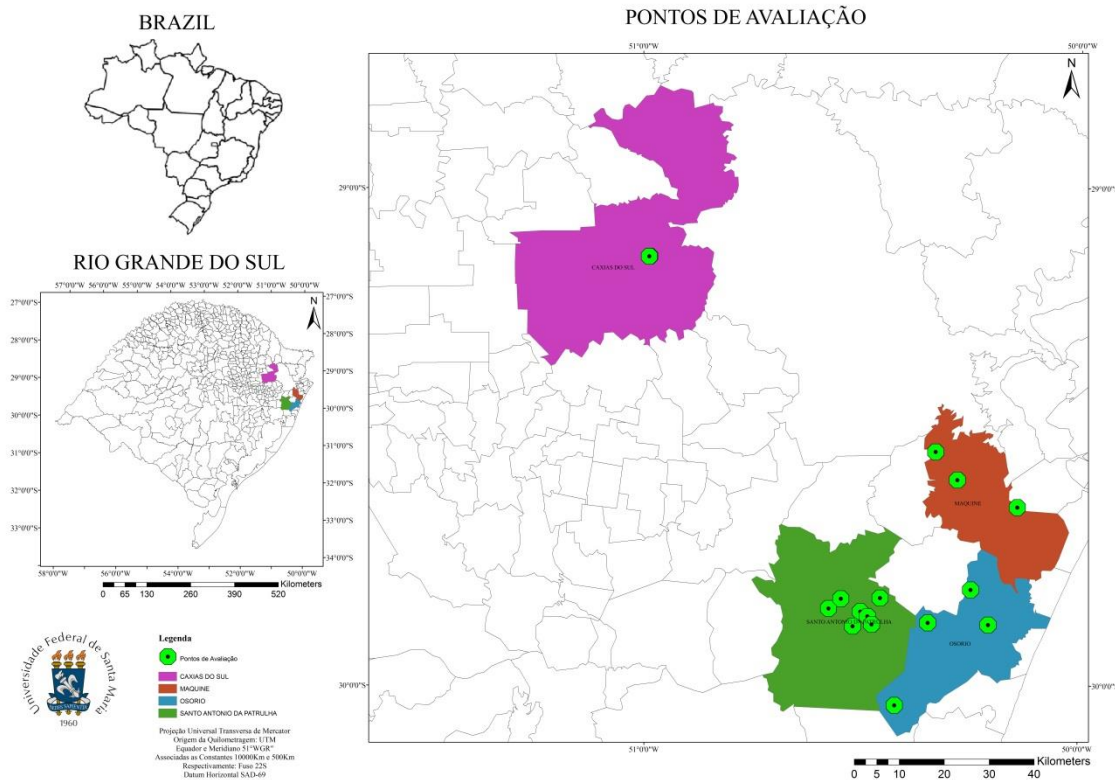
2- MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2015/2016, em lavouras comerciais de 3 municípios do litoral norte (Santo Antônio da Patrulha, Maquiné e Osório) e um da serra (Caxias do sul) do Rio Grande do Sul (Figura 1), 16 amostras compostas de solo e raízes de cana-de-açúcar foram coletadas cujos pontos foram georeferenciados GPS (*Global Position System*).

As amostras de solo e raízes foram retiradas nas linhas de plantio da cultura (DINARDO-MIRANDA, 2011) a uma profundidade entre 0 a 25 cm percorrendo-se a lavoura em zigue-zague, coletando-se em média 20 sub amostras para compor uma amostra composta de aproximadamente um 1 kg de solo e 100g de raízes dentro de um hectare.

A seguir, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, etiquetados e identificados quanto a cultivar e origem do material e levadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado para análise de quantificação e identificação do nematoide do gênero *Pratylenchus* presente nas amostras (Tabela 1).

Figura 1 – Mapa demonstrativo dos municípios abrangidos e dos pontos de coletas amostras de solo e raízes para avaliação da distribuição de espécies e nível populacional do nematoide das lesões nos canais do Rio Grande do Sul. Frederico Westphalen/RS, 2017.



Para a extração dos nematoides das amostras de solo, retirou-se uma alíquota de 100 cm³ de cada amostra, sendo esta processada através do método de peneiramento e flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964). Para avaliação das raízes, uma sub amostra de 10g de raiz foi processada em liquidificador, conforme metodologia de Coolen & D’Herd (1972). A identificação e quantificação do gênero de interesse das suspensões de solo e raiz, foi realizada preliminarmente com auxílio de microscópio estereoscópico utilizando-se a chave de Mai e Mullin (1996).

As populações de *Pratylenchus*, identificadas preliminarmente com base em características específicas, morfológicas dos espécimes, com base na chave de Mai e Mullin (1996), foram mantidas em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivar BRS 506 em casa de vegetação a 25 ± 5°C, para posterior identificação das espécies.

A identificação à nível de espécie de cada população de *Pratylenchus* sp., foi realizada através do processamento de amostras das raízes de sorgo cultivadas no solo proveniente das coletas através da técnica proposta por Coolen & D’Herd (1972), sendo montadas lâminas

temporárias com 20 fêmeas (TIHOHOD, 1993) para observações morfológicas e mensurações microscópicas.

As fotos de micrografias foram obtidas com as objetivas de 10X, 20X e 40X e objetivas de imersão 60X e 100X, sendo as mensurações das imagens realizadas com auxílio do software SPOT Advanced (2004). A identificação das espécies foi realizada com base nas características comprimento do corpo (L), comprimento do estilete (CE), número de anéis da região labial (NARL) distância da região anterior à vulva (DRAV) e distância da extremidade anterior da região labial à vulva (V) (LOOF,1991; GONZAGA, 2006).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as amostras obtidas nas áreas de produção de cana-de-açúcar do RS, onde foram realizadas as coletas observou-se que *Pratylenchus* esteve presente em todas as áreas obtidas (Tabela 1). Esse gênero, a nível mundial e no Brasil, é considerado o segundo grupo mais importante dos nematoides parasitas na cultura da cana, sendo superado apenas pelo nematoide das galhas (MOURA, ALMEIDA, 1981; MOURA et al., 1999; BLAIR, STIRLING, 2007; BERRY et al., 2007). Considerando dados de levantamentos ocorridos em diferentes regiões produtoras de cana do país, pode-se afirmar que mais de 70% das áreas cultivadas estão infestadas pelos gêneros *Meloidogyne* ou *Pratylenchus*. Na região noroeste do Paraná, por exemplo, *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. foram encontrados em 93 e 87% das áreas de plantio de cana-de-açúcar, respectivamente (SEVERINO et al., 2010). Moura et al. (2000) amostrando pontos em canaviais dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas analisaram um total de 1.097 amostras e constataram a ocorrência, principalmente, dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*.

A partir das análises das imagens das laminais temporárias montadas com 20 fêmeas de cada população, identificou-se *Pratylenchus zae* em 100% das amostras avaliadas (Tabela 2). Por outro lado, *P. brachyurus* foi detectado apenas na amostra coletada no município de Caxias do Sul, estando este em mistura com *P. zae* (6,25%), evidenciando, assim, sua menor distribuição (Tabela 2). Corroborando com estes resultados outro trabalho de levantamento em áreas de produção de cana-de-açúcar realizados na região noroeste e sul do RS constataram uma ocorrência de 84,61% de *P. zae* e 35,38% de *P. brachyurus* (BELLÉ, 2014), no estado do Paraná, Severino et al. (2010) relataram a presença do gênero *Pratylenchus* em 85,3% das amostras, e destas, 73% identificadas como *P. zae*.

Tabela 1 – Níveis populacionais de *Pratylenchus* sp. em raízes e solo de áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. Frederico Westphalen/RS, 2017.

N°	Localidade	Coordenadas Geograficas	Raízes(10g)	Solo (100cm ³)
			<i>Pratylenchus</i>	<i>Pratylenchus</i>
1	S. A. da Patrulha* 1 A**	-29.853288, -50.502207	4248	4600
2	S. A. da Patrulha 2 A	-29.882550, -50.519734	6438	3912
3	S. A. da Patrulha 3 A	-29.847141, -50.575512	10042	3866
4	S. A. da Patrulha 4 A	-29.862827, -50.485784	2860	4244
5	S. A. da Patrulha 5 A	-29.825809, -50.457019	6402	5286
6	S. A. da Patrulha 6 A	-29.827376, -50.547096	13560	9000
7	S. A. da Patrulha 7 A	-29.878890, -50.476200	6420	4680
8	Maquiné 10 A	-29.587988, -50.280565	13806	5880
9	Maquiné 12 A	-29.531545, -50.330690	8400	6986
10	Maquiné 13 A	-29.642310, -50.142377	2460	9480
11	Osório 14 A	-29.875269, -50.346835	9992	1920
12	Osório 15 A	-30.041247, -50.423053	10856	6852
13	Osório 18 A	-29.808562, -50.248645	15600	3340
14	Osório 20 A	-29.878842, -50.207789	6040	3720
15	Caxias do Sul 1	-29.139654, -50.987297	4690	2340
16	Caxias do Sul 2	-29.139866; -50.988245	12305	6740

* Santo Antônio da Patrulha, ** Sigla de identificação na coleção nematológica do laboratório de fitopatologia da Embrapa Clima Temperado.

De acordo com Barbosa et al. (2013) embora *Pratylenchus zae*, *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* sejam consideradas espécies-chave de nematoides na cana-de-açúcar no Brasil a espécie *P. brachyurus* é encontrado em amostras provenientes de canaviais de várias localidades.

A identificação da espécie ocorrente no local é de fundamental importância para que seja possível traçar estratégias de controle para o referido agente causador de dano, tratando-se de nematoides, a forma mais frequente para a realização desta é baseada principalmente em caracteres morfológicos e morfométricos (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores morfométricos de espécimes do gênero *Pratylenchus* coletados em canais de diferentes municípios do litoral e serra gaúcha obtidos a partir da mensuração de 20 fêmeas por amostra. Frederico Westphalen, 2017.

Procedência		L (μm)*	CE (μm)	NARL	DRAV (μm)	V (%)	Espécie	
Santo Antônio da Patrulha	1 A	Média	542,71	16,04	3	385,14	71,24	<i>P.zeae</i>
		Varição	(472,89 – 613,91)	(15,04 – 16,14)		(332,46 – 455,26)	(69,82 – 73,48)	
	2 A	Média	590,56	16,13	3	410,19	70,12	<i>P.zeae</i>
		Varição	(519,03 – 650,69)	(15,36 – 16,92)		(366,49 – 472,46)	(69,78 – 72,10)	
	3 A	Média	509,023	16,123	3	355,82	70,714	<i>P.zeae</i>
		Varição	(455,25 – 596,84)	(15,37 – 16,48)		(320,86 – 422,83)	(69,11 – 73,67)	
	4 A	Média	546,08	15,71	3	365,15	71,01	<i>P.zeae</i>
		Varição	(468,45 – 621,87)	(15,05 – 15,87)		(301,21 – 432,57)	(70,03 – 72,12)	
	5 A	Média	549,88	16,25	3	388,17	71,62	<i>P.zeae</i>
		Varição	(434,33 – 644,18)	(15,19 – 17,38)		(321,54 – 456,76)	(70,91 – 72,50)	
	6 A	Média	564,58	16,841	3	394,20	70,65	<i>P.zeae</i>
		Varição	(457,12 – 634,40)	(15,75 – 17,54)		(321,99 – 484,09)	(69,28 – 71,93)	

Continua

Procedência			L (µm)*	CE (µm)	NARL	DRAV (µm)	V (%)	Continua Espécie
Santo Antônio da Patrulha	7 A	Média	564,58	13,27	3	394,20	70,65	<i>P.zeae</i>
		Variação	(457,12-634,71)	(12,75- 15,00)		(321,97-484,08)	(69,67- 74,46)	
Maquiné	10 A	Média	540,21	15,37	3	382,08	71,38	<i>P.zeae</i>
		Variação	(471,26- 586,79)	(15,22 – 15,88)		(318,49 – 422,22)	(70,13 – 73,58)	
	12 A	Média	502,08	16,07	3	354,81	71,38	<i>P.zeae</i>
		Variação	(423,82 – 581,63)	(15,16 – 16,54)		(305,24 – 414,85)	(70,38 – 72,99)	
	13 A	Média	511,76	15,22	3	367,69	72,56	<i>P.zeae</i>
		Variação	(432,45 – 612,34)	(15,05 – 15,54)		(303,89 – 431,07)	(70,71 – 73,96)	
Osório	14 A	Média	527,95	14,94	3	379,01	72,87	<i>P.zeae</i>
		Variação	(441,80 – 63)	(14,42 – 15,69)		(312,64 – 445,21)	(70, 59 – 3,66)	
	15 A	Média	586,29	15,29	3	418,28	70,01	<i>P.zeae</i>
		Variação	(529,08 – 673,11)	(15,15 – 15,62)		(345,54 – 488,98)	(69,53 – 71,10)	

Continua

Procedência		L (µm)*	CE (µm)	NARL	DRAV (µm)	V (%)	Continua Espécie	
Osório	18 A	Média	533,93	16,04	3	380,07	71,79	<i>P.zeae</i>
		Varição	(431,82 – 615,04)	(15,08 – 16,17)		(354,01 – 455,58)	(69,44 – 72,72)	
	20 A	Média	570,15	15,75	3	395,52	70,20	<i>P.zeae</i>
		Varição	(439,91 – 651,08)	(15,03 – 16,99)		(370,49 - 458,44)	(69,11- 78,50)	
Caxias do Sul	1	Média	501,30	15,34	3	364,25	72,04	<i>P.zeae</i>
		Varição	(430,41 – 602,14)	(15,03 – 16,15)		(302,40 – 429,91)	(69,36- 73,15)	
	2	Média	532,17	17,82	2-3	401,44	74,54	<i>P. zeae</i> 48%
		Varição	(465,94 – 680,42)	(15,07 – 18,46)		(320,75 – 596,29)	(69,87- 85,89)	<i>P. brachyurus</i> 52%

*Comprimento do corpo (L), Comprimento do estilete (CE), Número de anéis da região labial (NARL), Distância da região anterior à vulva (DRAV) e Distância da extremidade anterior da região labial à vulva (V).

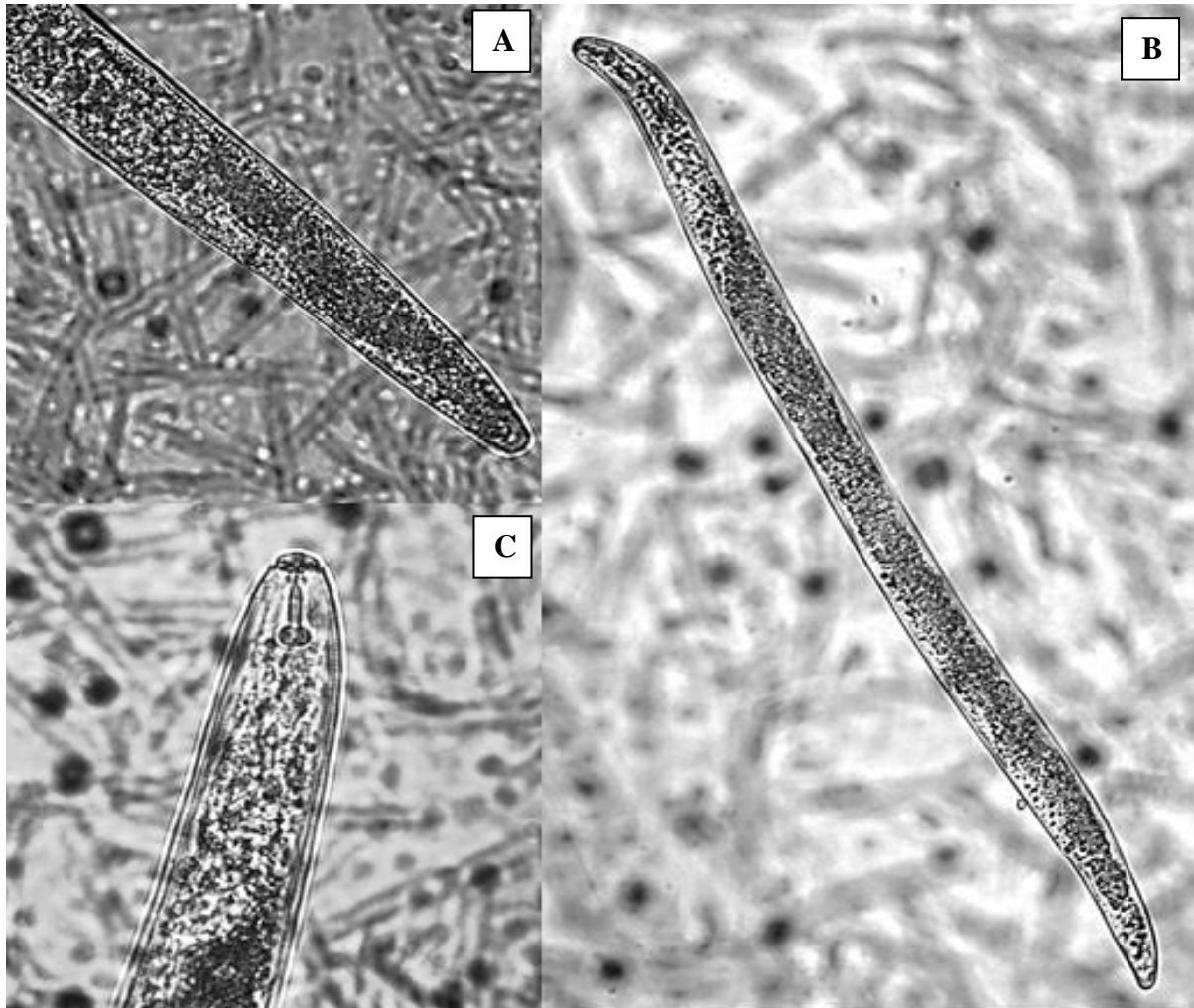
Nas amostras onde se identificou *P. zae*, foram observadas apenas fêmeas e juvenis; os espécimes adultos analisados apresentaram três anéis na região labial, achatamento na porção superior dos nódulos basais do estilete (Figura 2C), sendo esse um caráter morfológico relevante para a identificação da espécie. Entretanto o caráter diagnóstico mais marcante para a espécie é a posição mais anterior da vulva (Figura 2 A e 2 B) quando comparada a outra espécie desse gênero incluída nesse estudo, estando os resultados encontrados de acordo com os de Loof (1991) e Bellé (2014). A conformação da cauda dos espécimes das populações de *P. zae* observados no presente estudo foi predominantemente subaguda com término liso (Figura 2 A). Os resultados médios obtidos para os caracteres avaliados através das mensurações morfométricas (Tabela 2), foram compatíveis com os valores encontrados por Loof (1991) e por Gonzaga (2006).

Figura 2 – Fotomicrografia de *Pratylenchus zae* em microscópio óptico. A: parte posterior do corpo posição da vulva (100x), B: visão geral do corpo (20x), C: parte anterior de corpo região labial (100x). Frederico Westphalen/RS 2017.



Por outro lado, entre as especificidades da população *P. brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, ocorreram apenas fêmeas em detrimento a machos, as quais apresentaram região labial angulosa com o anel da base mais estreito que o primeiro anel do corpo (Figura 3 C), os nódulos basais do estile se mostraram massivos e arredondados e a posição da vulva se localizando mais posterior (Figura 3 A e 3 B) em relação à outra espécie de *Pratylenchus* envolvida neste estudo, além de apresentar cauda hemisférica com termino liso. Os parâmetros morfométricos preconizados por Loof (1991) e por Gonzaga (2006) também coincidiram com a identificação dessa espécie.

Figura 3 – Fotomicrografia de *Pratylenchus brachyurus* em microscópio óptico. A: parte posterior do corpo posição da vulva (100x), B: Visão geral do corpo (20x), C: parte anterior de corpo região labial (100x). Frederico Westphalen/RS 2017.



Analisando-se o resultado das áreas de produção de cana-de-açúcar amostradas neste estudo, observa-se que a frequência em que se encontra a espécie *P. brachyurus* é bem menor quando comparado a *P. zaeae*, porém o nível populacional de ambas as espécies foi considerado alto (Tabela 1), variando de 2460 a 15600 espécimes/10g de raízes e de 1920 a 9480 espécimes/ 100cm³ de solo. Este valor está bem acima do nível de dano econômico, conforme o critério de Barros et al. (2005) que consideram como alto valores acima de 1500 indivíduos de *Pratylenchus*/50 g de raízes.

Entre as espécies do nematoide das lesões que afetam a cultura da cana-de-açúcar destaca-se *P. zaeae* e *P. brachyurus*, sendo o primeiro o principal causador de danos (DINARDO-MIRANDA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008), embora a ocorrência de *P. brachyurus* vem crescendo, o que tem preocupado a comunidade científica, pois apesar de já terem sido conduzidos estudos para avaliar a agressividade comparando *P. zaeae* e *P. brachyurus* os mesmos não foram conclusivos quanto à agressividade de *P. brachyurus* com relação à cana-de-açúcar. (DINARDO-MIRANDA, 1990; DINARDO-MIRANDA, 2005).

Estudos conduzidos por Dinardo-Miranda et al. (1996) ressaltaram a elevada agressividade de *P. zaeae* na cultura da cana, pois a aplicação de nematicida em campo naturalmente infestado por este patógeno proporcionou um incremento de até 40 t/ha de cana, comprovando os danos causados a cultura e evidenciando a importância de estratégias de controle eficientes para o manejo destes fitonematoides, assim como a rotação de culturas, pois além de espécies de *Pratylenchus* também ocorrem em mistura com espécies de *Meloidogyne* (BELLÉ, 2014).

Este estudo de dispersão geográfica identificando a diversidade e nível populacional do nematoide das lesões relacionado à cultura da cana-de-açúcar pode levar a elaboração de estratégias de controle em níveis regionais, a partir do momento que se conhece o potencial de dano destes agentes após infestação das áreas de cultivo. Há também a necessidade de estudos mais conclusivos correlacionando nível populacional e agressividade dos mesmos em genótipos de cana adaptados ao Rio Grande do Sul.

4- CONCLUSÃO

Entre as amostras coletadas na região serrana e litoral norte do RS, *Pratylenchus zae* é a espécie mais frequente e ocorre em altos níveis populacionais.

A espécie *P. brachyurus* apresentou baixa ocorrência e alta densidade populacional.

Observou-se a ocorrência de populações mistas de *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus* em apenas uma amostra, coletada no município de Caxias do Sul.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J.M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V.C. Genome sequence of the metazoan plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v.26, p.909–915, 2008.
- AMORIM, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.). **Manual de Fitopatologia**. Doenças de Plantas cultivadas. Ceres; São Paulo, p.219-231. 2016.
- ARRUDA, P. Perspective of the sugarcane industry in Brazil. **Tropical Plant Biology**, , v. 4, p. 3–8, 2011.
- BARBOSA, B. F. F. **Estudo das inter-relações patógeno-hospedeiro de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) chitwood, *M. javanica* (treub) chitwood e *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) filipjev & schuurmans stekhoven em cana-de-açúcar**. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – NESP, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Entomologia Agrícola. Jaboticabal, 2008.
- BARBOSA, B. F. F.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, J. C.; SOARES, P. L. M.; RUAS, A. R.; CARVALHO, R. B. Aggressiveness of *Pratylenchus brachyurus* to sugarcane, compared with key nematode *P. zaeae*. **Nematropica**, v.43, n. 1, 2013.
- BARROS, A. C .B., MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Estudo de interação variedade-nematicida em cana-de-açúcar em solo naturalmente infestado por *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaeae*. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n.1, p.39-46, 2005.
- BELLÉ, C. **Fitonematoides na cultura da cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul: levantamento, caracterização e reação de genótipos a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus zaeae***. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Agronomia, Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Frederico Westphaeln, 2014.
- BELLÉ, C.; KULCZYNSKI, S. M.; KUHN, P. R.; DONINI, L. P.; GOMES, C. B. Reaction of sugarcane genotypes to parasitism of *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus zaeae*. **Revista Caatinga**, v. 30, n.2, p. 530-535, 2017.
- BERRY, S.; SPAULL, V. W.; CADET, P. Impact of harvesting practices on nematode communities and yield of sugarcane. **Crop Protection**, v. 26, p. 1239–1250, 2007.
- BLAIR, B. L.; STIRLING, G. R. The role of plant-parasitic nematodes in reducing yield of sugarcane in fine-textured soils in Queensland, Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v.47, p 620–634, 2007.
- CADET, P.; SPAULL, V.W. Nematode parasites of sugarcane. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIGE, J. (Eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford: **CABI Publishing**,. p. 645-674. 2005.

CASTILLO, P.; VOVLAS N. *Pratylenchus* (Nematoda, Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management. **Nematology Monographs and Perspectives**, v. 6, 529 p. 2007.

CASTILLO, P.; VOVLAS, N. **Bionomics and identification of the Genus *Rotylenchus* (Nematoda: Hoplolaimidae)**. Leiden, Netherlands Brill Academic Publishers, 377p. 2005.

CHAVES, A.; PEDROSA, E.M.R.; MOURA, R.M. Efeitos da aplicação de terbufós sobre a densidade populacional de nematóides endoparasitos em 5 variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. **Nematologia Brasileira**, v. 26 . 2, p.167-176, 2002.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; COUTO DE ABREU, H. M.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; LEE-BURNQUIST, W.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; DE OLIVEIRA-FIGUEIRA, A. V.; DE SOUSA-FILGUEIRAS, T.; GROSSI-DE-SÁ, M. DE F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; GUIMARÃES DE ANDRADE, M. L.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; DE CASTRO REINACH, F.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; DE CASTRO SILVA FILHO, M.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 62– 89, 2011.

CHERRY, T.; SZALANSKI, A.L.; TODD, T.C.; POWERS, T.O. The internal transcribed spacer of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). **Journal of Nematology**, v. 29, p. 23-29, 1997.

COOLEN, W. A., D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Agriculture Research Center – GHENT**.1972. p.77.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e *Pratylenchus zaei* (Nemata, Pratylenchidae) a duas variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), 51.f, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Manejo de nematoides em cana-de-açúcar. **Jornal Cana** v. 141, p. 64-69, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematoides: vilões subterrâneos. **Caderno Técnico Cultivar**, p. 3-6, abr. 2011.

DINARDO-MIRANDA, L. L. ; MORELLI, J. L.; LANDELL, M G A; SILVA, M A. Comportamento de genótipos de cana-de-açúcar em relação a *Pratylenchus zaei*. **Nematologia Brasileira**, v. 20, p. 52-58, 1996.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, M. A.; COELHO, A. L.; GARCIA, V.; MENEGATTI, C. C. Efeito da torta de filtro sobre as infestações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, v. 27, p. 61-67, 2003.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GIL, M.A.; GARCIA, V.; COELHO, A.L. Atividade de variedades de cana-de-açúcar em plantio de ano com nematicidas em área infestada por *Pratylenchus zaei*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 1,p. 23-26, 2004.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia** v. 67, p- 179-190, 2008.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas e nematóides em cana-de-açúcar. **Revista Opiniões**, p. 50-52, abr./jun. 2010.

DUNCAN, L. W.; MOENS, M. **Migratory endoparasitic nematodes**. In PERRY, R. N.; MOENS, M. (eds). *Plant Nematology*. Wallingford: CAB International. p. 123-153. 2006.

DEUNER, C.C.; GHISSI, V.C.; DEUNER, E.; TISCHER, A. Nematoides em Soja: distribuição populacional no Rio Grande do Sul. **Revista Plantio Direto – Edição conjunta** 142/143. 2015.

FERRIS, V.R.; FERRIS, J.M.; FAGHIHI, J. Variation in spacer ribosomal DNA in some cystforming species of plant-parasitic nematodes. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 16, p. 177-184, 1993.

GONZAGA, V. **Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação *in vitro* das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil.** 94f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo 2006.

IBRAHIM, S.K.; PERRY, R.N. BURROWS, P.R.; HOOPER, D.J. Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. **Journal of Nematology**, v. 26, p. 412-421, 1994

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

LOOF, P. A. A. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. In: NICKLE, W. R. (ed.). **Manual of agricultural nematology**. p. 363-421, 1991.

JOYCE, S.A.; REID, A.P.; DRIVER, S.; CURRAN, J. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. In: BURNELL, A.M; EHLERS, R.U.; MASSON, J.P. (Ed). **Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes**. Luxembourg, 1994, p. 178-187.

KUHN, P.R. **Diversidade da nematofauna em pomares de videira com sintomas de declínio e agressividade de *Mesocriconema xenoplax***. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente, RS, 2015.

LIMA-MEDINA, I. **Levantamento e caracterização do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) e das lesões (*Pratylenchus* spp.) em batata no sul do Brasil e estudo da patogenicidade em *Solanum* spp.** Tese. (Doutorado) Universidade Federal de Pelotas. Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. 2013.

MAI, W.F.; MULLIN, P.G. **Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera**. P. 277. 1996.

MOURA, R. M.; PEDROSA E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; M. E. A.; MACED; MOURA, A. M.; SILVA, E. G.; LIMA, R. F. Ocorrência dos nematóides *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 25: 101-103, 2000.

MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; MOURA, A. M.; SILVA, E. G. Nematoides associados á cana-de-açúcar no estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 92-99, 1999.

MOURA, R. M.; RÉGIS, E. M. O.; MOURA, A. M. Espécies e raças de *Meloidogyne* assinaladas em cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 14, p. 33-38, 1990.

MOURA, R.M.; ALMEIDA, A.V. Estudos preliminares sobre a ocorrência de fitonematoides associados à cana-de-açúcar em áreas de baixa produtividade agrícola no estado de Pernambuco. In: **Reunião Brasileira de Nematologia**, V, Piracicaba. Resumos, p. 213-220. 1981.

NOVARETTI, W. R. T.; TÉRAN, F. O. Controle de nematoides parasitos da cana-de-açúcar. **Reunião Técnica Agronômica**. p. 16-24, 1983

NOVARETTI, W.R.T. **Controle de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zae* (Nemata: Tylenchoidea) em cana-de-açúcar com nematicidas, associados ou não à matéria orgânica**. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 51 p, 1997.

NOVARETTI, W.R.T.; DINARDO, L.L.; TERAN, F.O.; CARDERÁN, J.O.; TOTINO, L.C. Nematoides associados à cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, II, Piracicaba. Resumos, p. 296-312, 1984.

OLIVEIRA, F. S., ROCHA, M. R.; TEIXEIRA, R. A.; FALEIRO, V. O.; SOARES, R. A. B. Efeito de sistemas de cultivo no manejo de populações de *Pratylenchus* spp. na cultura da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, v. 32, p. 117-125, 2008

ORUI, Y. Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. **Applied Entomology and Zoology**, v. 31, p. 505-514, 1996.

POWERS, T.; TODD, T. C.; BURNELL, A.M.; MURRAY, P.C.B.; FLEMING, C.C.; SZALANSKI, A.L.; ADAMS, B.A.; HARRIS, T.S. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. **Journal of Nematology**, v. 29, p. 441-450, 1997.

SANTOS, P.S.; REBELATO, G.; DALLA FAVERA, D.; DAL SOTTO, R.; BALARDIN, R.; MADALOSSO, M.G. Mapa dos Nematoides. **Revista Cultivar grandes culturas**. Ano XV, nº 187. Dezembro de 2014.

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

SEVERINO, J. J.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; TESSMANN, D. Nematodes associated with sugarcane (*Saccharum* spp.) in sandy soils in Paraná, Brazil. **Nematropica**, v. 40, n.1, 2010.

SEVERINO, J.J. **Levantamento e identificação de nematoides na cultura da cana-de-açúcar, na região noroeste do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá. 66 p. 2007.

SOMAVILLA, L. **Levantamento, caracterização do nematoide das galhas em videira nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e estudo da resistência de porta-enxertos a *Meloidogyne* spp.** Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pelotas – Pelotas. 2011.

SUBIRÓS-RUIZ, F. **El cultivo de la caña de azúcar**. San José: UNED, p. 419, 1995.

SUBBOTIN, S.A.; WAEYENBERGE, L.; MALOKANOVA, I.A.; MOENS, M. Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometrics and rDNA-RFLPs. **Nematology**, v. 1, p. 195-207, 1999.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal, FUNEP. P.372 1993.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000.

VRAIN, T.C.; McNAMARA, D.G. Potential for identification of quarantine nematodes by PCR. **EPPO Bulletin**, v. 24, p. 453-458, 1994.

VRAIN, T.C.; WAKARCHUK, D.A.; LÈVESQUE, A.C.; HAMILTON, R.I. Intraspecific rDNA restriction fragment polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 15, p. 563-573, 1992.

WAEYENBERGE, L.; RYSS, A.; MOENS, M.; PINOCHET, J.; VRAIN, T.C. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. **Nematology**, v. 2, p. 135-142, 2000.

WENDT, K.R.; VRAIN, T.C.; WEBSTER, J.M. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment polymorphism. **Journal of Nematology**, v. 25, p. 555-563, 1993.

ZIJLSTRA, C.; LEVER, A.E.M.; VENK, B.J.; VAN SILFHOUT, C.H. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. **Phytopathology**, v. 85, p. 1231-1237, 1995.

CAPITULO II: AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE *Pratylenchus zae* E *P. brachyurus* EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.

1- INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar esta difundida em todas as regiões brasileiras e seu cultivo possui grande importância econômica para o agronegócio brasileiro, consolidando-se fortemente neste seguimento, e ocupando, assim, posição de destaque devido, principalmente, à geração de combustível renovável, bem como pela sua importância na fabricação de derivados alimentícios (CARVALHO et al., 2013).

No Rio Grande do Sul, a cultura encontra-se distribuída em uma área superior 1,2 mil ha com uma produção média anual de 61,2 mil toneladas (CONAB, 2016), sendo destinada para a produção de álcool, açúcar, melado, rapadura, aguardente além de ser utilizada para alimentação animal. A demanda elevada pelos derivados da cana-de-açúcar, principalmente o açúcar e o álcool, faz com que seja necessário o aumento da produtividade, uma vez que torna-se necessário produzir cada vez mais e em menos área, sendo assim necessários maiores estudos em melhoramento genético, adaptabilidade para diferentes regiões produtoras, manejo nutricional, bem como estudos fitossanitários.

Dentre os problemas fitossanitários dos canaviais, destacam-se as doenças causadas por nematoides, cujos prejuízos variam com o grau de resistência das plantas e com a densidade populacional da praga no solo (NOVARRETI et al., 1997). No Brasil, os nematoides mais frequentes e relacionados aos danos na cultura da cana-de-açúcar são o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) e o das lesões (*Pratylenchus* spp.) (MOURA et al., 2000). *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood por Treub, e *Pratylenchus zae* Graham (1951) causam, em média, 20 a 30% de redução de produtividade, em variedades suscetíveis, enquanto *M. incognita* pode ocasionar perdas maiores, ao redor de 40%, mas em casos de alta infestação e elevada suscetibilidade as perdas podem alcançar 50%. Estas perdas somadas com as perdas em cana soca, que podem atingir redução de 10 a 20 t/há/corte, ocasionam diminuição drástica da produtividade e de longevidade do canavial (DINARDO-MIRANDA, 2005). Pode-se afirmar que as perdas são variáveis em função dos fitonematoides envolvidos, seus níveis populacionais, da suscetibilidade da variedade, além do período de cultivo do ano (NOVARETTI et al., 1978).

Os danos causados por fitonematoides na cana ocorrem no sistema radicular, local onde estes parasitas drenam nutrientes para o seu desenvolvimento, afetando negativamente o

metabolismo da planta. Além disso, esses parasitas injetam toxinas, que no caso de *Meloidogyne* sp. resultam na formação de galhas. Quando as raízes são atacadas por *Pratylenchus* sp., as mesmas apresentam lesão que inicialmente descrevem-se como manchas avermelhadas, e, posteriormente a área afetada torna-se escurecida e necrosada. Como consequência do ataque dos nematoides, ocorre à redução do número de raízes da planta, reduzindo assim a absorção de água e nutrientes, que contribuem para o surgimento de sintomas reflexos na parte aérea como: plantas com estatura menor, amareladas, murchas nas horas mais quentes do dia, e, conseqüentemente, redução do seu potencial produtivo (DINARDO-MIRANDA, 2005).

Segundo Novaretti et al. (1988) as espécies *P. zae* e *P. brachyurus* são as mais destrutivas para a cultura em questão, estando disseminados em grande proporção nos canaviais de todo o mundo, sendo *P. zae* a espécie mais comumente encontrada (CADET, SPAULL, 2005; DUNCAN, MOENS, 2006). No Brasil *P. zae* é uma das espécies de nematoides de maior importância para a cultura da cana-de-açúcar, levando a reduções expressivas na produtividade agrícola em áreas infestadas em função dos danos causados no sistema radicular das plantas (GOMES, NOVARETTI, 1985; DINARDO-MIRANDA et al., 2001), confirmando sua patogenicidade a cultura (SUNDARARAJ, MEHTA, 1994; DINARDO-MIRANDA et al., 2004; BARROS et al., 2005; MOURA, OLIVEIRA, 2009). Da mesma forma *P. brachyurus* também é comumente encontrado em canaviais brasileiros, entretanto, sua patogenicidade para a cultura ainda não está estabelecida (DINARDO-MIRANDA et al., 2005).

O controle de fitonematoides em cana-de-açúcar é complexo e, após o estabelecimento desses patógenos na área, a erradicação torna-se praticamente impossível, sendo preciso manejá-las utilizando diversas técnicas de forma que a produtividade não seja prejudicada. Dentre essas, cita-se o uso de nematicidas, rotação de culturas, revolvimento do solo nas épocas mais quentes do ano, variedades resistentes ou tolerantes, e a incorporação de matéria orgânica (DINARDO-MIRANDA et al., 1995; BARROS et al., 2000). O plantio de variedades resistentes ou tolerantes é a forma mais simples de conviver com os nematoides na agricultura (NOVARETTI et al., 1988), pois é um método prático, econômico e não interfere nas outras práticas culturais, não apresenta problemas com resíduos indesejáveis e suprime as populações de nematoides, porém para que essa ferramenta esteja disponível por mais tempo é necessário boas práticas de manejo, integrando várias formas de controle desses parasitas (LORDELLO, 1981). Entretanto, poucos são os genótipos com alguma resistência disponíveis no mercado nacional e que são ambientados às condições climáticas do RS.

Além disso, tem-se observado que as características produtividade e resistência a nematóides são inversamente correlacionadas, e, no campo, é comum a ocorrência de populações mistas, dificultando a escolha do material a ser plantado.

No Brasil, são poucos os relatos a respeito de cultivares de cana-de-açúcar que apresentam resistência ou tolerância a *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus*. Dentre os trabalhos encontrados na literatura, destacam-se os realizados por Dinardo-Miranda (1994), Dinardo-Miranda et al. (1996), Barbosa (2008), Barbosa (2012) e de Bellé et al. (2017).

Considerando-se o potencial patogênico de *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus* em plantas de cana-de-açúcar e a carência de trabalhos referentes à agressividade dessas espécies a cana-de-açúcar, fica evidente a necessidade de mais estudos nessa área. Deste modo, teve-se por objetivo no presente trabalho, avaliar a agressividade de populações do nematoide das lesões, *P. zae* e *P. brachyurus*, a dois genótipos distintos de cana-de-açúcar.

2- MATERIAL E METODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Instituto Federal Farroupilha, campus Frederico Westphalen - RS, no período de maio de 2016 a janeiro de 2017. As avaliações foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria campus de Frederico Westphalen - RS.

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas dois genótipos de cana-de-açúcar, RB935581 (C1) e RB966928 (C2), os quais em estudo anterior apresentaram maior e menor níveis de suscetibilidade a *Pratylenchus zae* respectivamente (BELLÉ et al., 2017), As mudas de cana foram obtidas a partir de mini rebolo, provenientes da Embrapa Clima Temperado.

Os inóculos de *P. brachyurus* e *P. zae* foram preparados a partir de populações puras da coleção nematológica da Embrapa Clima Temperado, mantidas em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivar BRS 506, em solo autoclavado. Foram utilizadas quatro populações de *Pratylenchus*, sendo três populações de *P.zae*, provenientes de Crissiumal (PzCr), Pelotas (PzPl) e Caxias do Sul (PzCS) e uma população de *P. brachyurus* proveniente de Porto Xavier (PbPX). As mudas de cana-de-açúcar foram transplantadas para vasos com capacidade para 5 litros contendo solo e substrato comercial estéril na proporção 2:1, utilizando-se uma planta/vaso/repetição. Posteriormente, realizou-se a inoculação dos nematoides com uma suspensão contendo 1000 espécimes por repetição obtidos conforme método de Coolen & D'Herdt (1972) a qual foi depositada em dois orifícios próximos ao colo

da planta. Os vasos contendo as plantas foram mantidos em casa de vegetação a temperatura ambiente por um período de 240 dias.

A viabilidade dos inóculos foi verificada nas mudas de sorgo BRS 506 (*Sorghum vulgare* L.), as quais também receberam o mesmo nível de inóculo das plantas de cana-de-açúcar.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (genótipos de cana) x 5 (4 populações de *Pratylenchus* e um tratamento sem inoculação), utilizando-se seis repetições tratamento.

Decorridos 240 dias da inoculação, as plantas foram retiradas de cada vaso, separando-se raiz e parte aérea para avaliação. O sistema radicular de cada planta foi lavado, pesado e processado para extração dos nematoides (população final) conforme Coolen & D'Herdt (1972) para quantificação de população final e determinação do fator de reprodução do nematoide ($FR = \text{população final} / \text{população inicial}$), conforme Oostenbrink (1966). As variáveis analisadas para parte aérea foram: altura de planta até o ápice da maior folha, diâmetro do colmo no primeiro entrenó, número de perfilhos e massa fresca. A agressividade foi avaliada pela interferência das populações do nematoide no desenvolvimento das plantas e sua reprodução nos diferentes genótipos.

Os valores das diferentes variáveis obtidos em cada repetição foram submetidos à análise de variância, sendo as médias de cada tratamento comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SAS (SAS 9.3, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados apresentados na tabela 1, verifica-se que todas as populações de *Pratylenchus* spp. reproduziram-se em ambas as cultivares de cana-de-açúcar, ($FR > 1$), demonstrando diferentes níveis de agressividade. Estas variações referentes ao índice de fator reprodutivo das populações podem estar associadas a condições climáticas, umidade do solo, bem como a virulência intrínseca das populações utilizadas para a condução dos estudos, porém em todos os casos onde o fator de reprodução for maior que 1 podem ocorrer danos ao potencial produtivo da cultura.

Tabela 1 – Fator de reprodução de nematoides do gênero *Pratylenchus* inoculados em cana-de-açúcar. Frederico Westphalen /RS, 2017.

Cultivar	Fator de reprodução				
	PbPX**	PzCr	PzPI	PzCS	CV%
RB935581	8,96 B a*	10,60 AB a	12,58 A a	3,845 C a	21,73
RB966928	8,33 A a	7,85 A a	7,43 A b	4,79 B a	19,09
CV%	16,68	20,48	20,16	29,26	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade do erro. ***P. brachyurus* origem Porto Xavier (PbPX), *P. zaeae* origem Crissiumal (PzCr), *P. zaeae* origem Pelotas (PzPI) e *P. zaeae* origem Caxias do Sul (PzCS).

De acordo com os resultados da Tabela 1, para o genótipo RB935581, a população PzPI (FR=12,58) foi a que demonstrou maior fator de reprodução não diferindo estatisticamente da população PzCr (FR=10,60), destacando agressividade em relação as demais. Em relação à reprodução de *Pratylenchus* no genótipo RB966928, as populações de *P. zaeae* (PzPI e PzCr) e de *P. brachyurus* (PbPX), apresentaram os maiores valores de FR e não diferiram entre si. Já a população de PzCS apresentou o menor FR diferindo estatisticamente das demais populações para ambos os genótipos. Corroborando com este resultado vários autores (DINARDO-MIRANDA, 1994, DINARDO-MIRANDA et al., 1996; DINARDO-MIRANDA et al., 2003; DINARDO-MIRANDA et al., 2004; DINARDO-MIRANDA, 2005; BARBOSA, 2008 e 2012; BARBOSA et al., 2013; BARROS et al., 2000; BARROS et al., 2005; NOVARETTI et al., 1998; BELLÉ 2014 e BELLÉ et al., 2017) já relataram patogenicidade de *P.zaeae* em cana-de-açúcar, caracterizando-o como uma das espécies de maior importância econômica e frequentemente encontrada em várias regiões produtoras de cana de açúcar no Brasil.

Bellé et al. (2017) avaliando a reação de genótipos de cana a um isolado de *P. zaeae*, observaram, nos mesmos genótipos estudados, RB935581 e RB96928, fatores de reprodução igual a 26,31 e 8,54, respectivamente, caracterizando-os em dois níveis de suscetibilidade, colaborando com o exposto acima.

A patogenicidade de *P. brachyurus* em cana, embora demonstrada neste estudo, e em estudos semelhantes conduzidos por Diardo-Miranda (1994) e Barbosa (2008) apresenta níveis diferentes de agressividade. Semelhantemente Barbosa (2013), avaliando agressividade de *P. zaeae* e *P.brachyurus* em cana constatou que a população de *P. brachyurus* foi mais agressiva, causando maior redução na produtividade. Entretanto, ainda se tem escassez de informações quanto à reação e a agressividade das diferentes populações, evidenciando a

necessidade de estudos mais aprofundados, uma vez que a patogenicidade de *P. brachyurus* ainda não está completamente elucidada (DINARDO-MIRANDA, 2005).

Para ambos os genótipos de cana a infestação de *P. brachyurus* (PbPX) o fator de reprodução foi similar, chegando a 8,96 para o genótipo RB935581 e 8,33 para o genótipo RB 966928 (Tabela 1), demonstrando a suscetibilidade destes genótipos a esta espécie de *Pratylenchus*. Outros trabalhos também relatam a capacidade de multiplicação de *P. brachyurus* em cana-de-açúcar, demonstrada através de $FR > 1$ (BARBOSA, 2008; DINARDO-MIRANDA, 1994).

A espécie *P. brachyurus* é mencionada também como parasita em outras culturas pertencentes a família das Poaceae, tais como milho (INOMOTO, 2011; FERREIRA, 2010; CARMO et al., 2015) azevém, milheto e capim-sudão (GABRIEL, 2016), demonstrando plasticidade e a necessidade da condução de mais trabalhos na área visando práticas e estratégias de controle.

Considerando-se a reprodução dos nematoides dentro dos genótipos observa-se diferença significativa somente para populações de *P. zae* (PzPl) (Tabela 1), onde a cultivar RB935581 apresentou maior valor de FR justificando que existem diferenças quanto a agressividade de populações de *Pratylenchus* em cana-de-açúcar.

De acordo com a tabela 2 os genótipos e suas diferentes populações de *P. zae* e *P. brachyurus*, diferiram quanto aos parâmetros vegetativos, sendo observada interação significativa apenas para os parâmetros diâmetro do colmo e peso fresco de raiz, onde as inoculações das diferentes populações de *Pratylenchus* interferiram negativamente sobre estes em relação à testemunha.

Tabela 2- Influência das populações de *Pratylenchus* sobre as variáveis vegetativas de cana-de-açúcar: altura, diâmetro do colmo (DC), massa fresca de raiz (MFR), número de perfilho (N° perfilho) e massa fresca de parte aérea (MFPA). Frederico Westphalen/RS 2017.

Tratamento	Altura	DC	PFR	N° perfilho	MFPA
Genótipo					
RB935581	2,28 b ¹	19,92 b	693,14 a	9,15 a	741,63 a
RB966928	2,72 a	20,81 a	392,39 b	2,52 b	708,78 a
Nematoide					
PbPX	2,53 ab	19,71 bc	480,83 b	5,80 a	661,67 c
PzCr	2,60 ab	19,77 bc	449,71 b	5,15 b	719,60 bc

Continua

Continua					
Tratamento	Altura	DC	PFR	Nº perfilho	MFPA
PzPI	2,67 a	18,77 c	462,31 b	6,00 a	702,94 bc
PzCS	2,38 ab	20,87 b	510,29 b	6,87 a	799,73 a
Testemunha	2,28 b	23,28 a	877,67 a	5,25 a	753,58 ab
Genótipo	0,0001**	0,0173 ns	0,0001**	0,001**	0,04 ns
Nematoide	0,0792 ns	0,0001**	0,0001**	0,39 ns	0,0004*
G x N	0,060 ns	0,033*	0,0457*	0,15 ns	0,14 ns
CV%	12,89	6,72	17,66	35,98	8,68

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste da ANOVA. **Altamente significativo *Significativo e (ns) não significativo. Genótipo versus nematoide (G x N).

Considerando a patogenicidade das diferentes populações de *Pratylenchus* aos genótipos de cana-de-açúcar verifica-se que todas as populações afetaram negativamente o desenvolvimento de ambos os genótipos de cana-de-açúcar reduzindo o diâmetro do colmo em relação à testemunha não inoculada (Tabela 3). A população PzPI foi a que expressou maior agressividade para o genótipo RB935581 diminuindo significativamente o diâmetro do colmo quando comparada com as demais populações. Já para o genótipo RB966928 não foi observada diferença entre os isolados. Considerando a agressividade dos isolados para os genótipos observou-se diferenças significativas apenas para PzCS, a qual foi mais agressiva promovendo maior redução do diâmetro do colmo para a cultivar RB935581.

Tabela 3 – Parâmetros vegetativos de cultivares de cana-de-açúcar submetidas à inoculação com diferentes populações de *Pratylenchus zae* e *P.brachyurus*. Frederico Westphalen/RS, 2017.

Diâmetro do Colmo (mm)						
Genótipo	PbPX**	PzCr	PzPI	PzCS	Test	CV%
RB935581	19,72 Ba	20,19 Ba	18,12 Ca	20,30 Bb	21,61 Aa	4,02
RB966928	19,71 Ba	19,36 Ba	19,42 Ba	21,44 Ba	24,59 Aa	8,47
CV%	5,13	50,70	5,54	3,03	11,51	
Peso fresco de raiz (gr)						
	PbPX	PzCr	PzPI	PzCS	Test	CV%
RB935581	633,20 Ba	581,74 Ba	575,64 Ba	636,23 Ba	1125,33 Aa	10,99
RB966928	328,50 Bb	317,68 Bb	348,98 Bb	384,35 Bb	630,00 Ab	28,59
CV%	33,70	14,34	16,58	13,49	6,75	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. ***P. brachyurus* origem Porto Xavier (PbPX), *P. zae* origem Crissiumal (PzCr), *P. zae* origem Pelotas (PzPI) e *P. zae* origem Caxias do Sul (PzCS).

Analisando a interação genótipo verso nematoide observa-se que todos os isolados de *Pratylenchus* interferiram negativamente no peso fresco de raiz de ambos os genótipos de cana quando comparados com a testemunha. Considerando a agressividade dos isolados, os mesmos demonstraram maior agressividade para o genótipo RB966928, a qual apresentou menor desenvolvimento de raiz.

A interferência negativa sobre o desenvolvimento das plantas devido à incidência de *Pratylenchus* spp também foi observada por Dinardo-Miranda (2005) que relatou que em consequência do ataque deste nematoide em cana há redução do número de raízes, menor absorção de água e nutrientes e conseqüentemente as plantas ficam menores e amareladas.

Segundo Blair (2005), 20 dias após o plantio, em área infestada por *P. zae*, ficou evidenciada a redução no desenvolvimento da parte aérea da cana-de-açúcar, indicando que *P. zae* afeta o estabelecimento inicial da cultura. Por outro lado, o controle de *P. zae* promoveu aumento significativo no peso e no comprimento da parte aérea e do sistema radicular (MEHTA, SUNDARARAJ, 1995).

Vários trabalhos disponíveis na literatura relacionados à resistência genética da cana-de-açúcar ao nematoide das lesões radiculares evidenciam diferentes graus de suscetibilidade da cultura, mas não evidenciam diferenças quanto à agressividade do patógeno, quando analisados parâmetros de desenvolvimento de plantas. Barbosa (2012) avaliando o efeito de *P. brachyurus* e *P. zae* sobre os parâmetros perfilhamento, massa fresca, diâmetro do colmo e comprimento até a primeira folha, não identificou diferenças significativas para estes parâmetros quando comparadas entre si, porém observou efeito negativo de ambas quando comparadas a testemunha (sem inoculação). Ainda, Dinardo-Miranda (1994) também avaliando plantas de cana quanto ao número de perfilhos, comprimento do maior perfilho (altura de planta), peso verde de raiz e peso verde de parte aérea em plantas inoculadas com *P.zae* e *P. brachyurus* verificou poucas diferenças significativas entre os valores das plantas de parcelas testemunha e daquelas inoculadas com uma ou outra espécie de nematoide.

Em avaliações feitas por Barbosa (2008) utilizando nove variedades e buscando verificar o efeito de *P. brachyurus* sobre as variáveis, massa fresca de parte aérea, diâmetro do colmo e altura até a primeira folha constatou efeito negativo do nematoide na maioria das cultivares, no entanto apenas uma das variedades foi considerada suscetível com fator de reprodução de 2,3. Corroborando com o exposto acima Dinardo-Miranda (1999) avaliando o comportamento de seis genótipos ao parasitismo de *P. zae*, constatou redução na produtividade que variou entre 8,6 a 29,4 t/ha deixando evidente as perdas causadas por essas pragas aos canaviais infestados.

Este fato somado a evidência de que os dois genótipos foram suscetíveis a presença de todos os nematóides $FR > 1$, confirma que estas pragas tem potencial de causar danos reais as cultivares, sendo necessário implementar práticas de controle quanto a presença destas nos canaviais.

4- CONCLUSÃO

Todos os isolados se reproduziram em ambos os genótipos de cana-de-açúcar, demonstrando níveis de agressividade distintos.

Ambos os genótipos de cana apresentaram suscetibilidade aos isolados de *P. zea* e *P. brachyurus*.

As populações de nematoides influenciaram negativamente o desenvolvimento das plantas, com maior intensidade nos parâmetros diâmetro de colmo e peso de raiz.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, B. F. F. **Agressividade comparada de *Pratylenchus brachyurus* com *P. zae* e eficácia de métodos de controle de nematoides em cana-de-açúcar.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal). Jaboticabal, 2012.

BARBOSA, B. F. F. **Estudo das inter-relações patógeno-hospedeiro de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) chitwood, *M. javanica* (treub) chitwood e *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) filipjev & schuurmans stekhoven em cana-de-açúcar.** Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – NESP, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Entomologia Agrícola. Jaboticabal, 2008.

BARBOSA, B. F. F.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, J. C.; SOARES, P. L. M.; RUAS, A. R.; CARVALHO, R. B. **Aggressiveness of *Pratylenchus brachyurus* to sugarcane, compared with key nematode *P. zae*.** *Nematropica*, v.43, n. 1, 2013.

BARROS, A. C. B., MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. **Estudo de interação variedade-nematicida em cana-de-açúcar em solo naturalmente infestado por *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zae*.** *Nematologia Brasileira*, v. 29, n.1, p.39-46, 2005.

BARROS, A. C. B., MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. **Aplicação de terbufós no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 – Efeitos na cana planta.** *Nematologia Brasileira*, v. 24, p. 73-78, 2000.

BELLÉ, C. **Fitonematoides na cultura da cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul: levantamento, caracterização e reação de genótipos a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus zae*.** Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Agronomia, Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Frederico Westphaeln, 2014.

BELLÉ, C.; KULCZYNSKI, S. M.; KUHN, P. R.; DONINI, L. P.; GOMES, C. B. **Reaction of sugarcane genotypes to parasitism of *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus zae*.** *Revista Caatinga*, v. 30, n.2, p. 530-535, 2017.

BLAIR, B.L. **The incidence of plant-parasitic nematode on sugarcane in Queensland, and studies on pathogenicity and associated crop losses, with particular emphasis on lesion nematode (*Pratylenchus zae*).** Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia). James Cook University. 208p. 2005.

CADET, P.; SPAULL, V.W. **Nematode parasites of sugarcane.** In: Luc, M.; Sikora, R.A.; Brige, J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture.** Wallingford: CABI Publishing,. p. 645-674. 2005.

CARMO, B. V.; VALE, D. M.; ARAUJO, F. G. **Hospedabilidade de híbridos comerciais de milho ao *Pratylenchus brachyurus*.** IV Congresso Estadual de Iniciação Científica do IF Goiano 2015.

CARVALHO, M. M.; BUENO, R. C. O. F.; CARVALHO, L. C.; GODOY, A. F.; FAVORETO, A. Importância econômica e generalidades para o controle de *Telchin licus* drury, 1773 (Lepidoptera: Castniidae) em cana-de-açúcar. **Enciclopédia Biosfera** v.9, n.17, p.1623, 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, quarto levantamento, abril/2016.** Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_p_ortugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf> Acessado em 10 de fev. 2017.

COOLEN, W. A., D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extration of nematodes from plant tissue. **State Agriculture Research Center – GHENT.** 1972. p.77.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Hospedabilidade de oito variedades de cana-de-açúcar a *pratylenchus brachyurus* e *P. zaeae*. **Nematologia Brasileira** v.18, 1994.

DINARDO-MIRANDA, L.L., NOVATETTI, W.R.T.; MORELLI, J.L.; NELLI, E.J. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em relação a *Meloidogyne javanica* em condições de campo. **Nematologia Brasileira**, v. 19 n. 2, p. 60-66, 1995.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Manejo de nematoides em cana-de-açúcar. **JornalCana** v. 141, p. 64-69, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L. ; MORELLI, J. L.; LANDELL, M G A; SILVA, M A. Comportamento de genótipos de cana-de-açúcar em relação a *Pratylenchus zaeae*. **Nematologia Brasileira**, v. 20, p. 52-58, 1996.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, M. A.; COELHO, A. L.; GARCIA, V.; MENEGATTI, C. C. Efeito da torta de filtro sobre as infestações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, v. 27, p. 61-67, 2003.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, M. A.; GARCIA, V.; COELHO, A. L. Produtividade de variedades de cana-de-açúcar em plantio de ano com nematicidas em área infestada com *Pratylenchus zaeae*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, p. 23-26, 2004.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Reação de variedades de cana-de-açúcar ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita*. **Nematologia Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 76-83, 1999.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Efeito de carbofuran sobre a cana-de-açúcar infestada ou não por nematoides. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 4, 436-438, 2001.

DUNCAN, L. W.; MOENS, M. **Migratory endoparasitic nematodes.** In PERRY, R. N.; MOENS, M. (eds). Plant Nematology. Wallingford: CAB International. p. 123-153. 2006.

FERREIRA, A. D. **Reação de genótipos de soja e milho ao nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal. Goiânia 2010.

GABRIEL, M. **Qualidade fisiológica, sanitária e reação de resistência a fitonematoides em sementes forrageiras**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Frederico Westphalen, 2016.

GOMES, R. S.; NOVARETTI, W. R. T. Levantamento de nematoides parasitos da cana-de-açúcar na usina Bonfim. **Nematologia Brasileira**, v. 9, n.1, p.135-141, 1985.

INOMOTO, M. M. Avaliação da resistência de 12 híbridos de milho a *Pratylenchus brachyurus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 5, p. 308 – 212, 2011.

LORDELLO, L.G.E. **Nematoides das plantas cultivadas**, 6ª. Ed. São Paulo: Nobel. 314p. , 1981.

MEHTA, U.K.; SUNDARARAJ, P. Efficacy of some new soil amendments for the control of the lesion nematode in sugarcane. **Nematologia Mediterranea**, v. 23, n. 4, p. 321-323, 1995.

MOURA, R. M.; PEDROSA E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; M. E. A.; MACED; MOURA, A. M.; SILVA, E. G.; LIMA, R. F. Ocorrência dos nematóides *Pratylenchus zaeae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 25: 101-103, 2000.

MOURA, R.M; OLIVEIRA, I.S.O. Controle populacional de *Pratylenchus zaeae* em cana-de-açúcar, em dois ambientes edáficos no nordeste do Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 33, p. 67–73, 2009.

NOVARETTI, W.R.T.; LORDELLO, L.G.E.; ELLI, E.J.; WENING FILHO, G. Viabilidade econômica do nematicida carbofuran na cultura da cana-de-açúcar. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, v.3, p. 117-131, 1978.

NOVARETTI, W. R. T., A. MONTEIRO, L. C. B. Controle químico de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zaeae* em cana-de-açúcar com carbofuran e terbufós. **Nematologia Brasileira**, v.22,p.60-73, 1998.

NOVARETTI, W.R.T. **Controle de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zaeae* (Nemata: Tylenchoidea) em cana-de-açúcar com nematicidas, associados ou não à matéria orgânica**. (Tese de Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 51 p, 1997.

NOVARETTI, W.R.T., CARDERÁN, J.O.; CARPANEZI, A.; RODRIGUES, J.C.S. Comportamento de três variedades de cana-de-açúcar em relação ao nematoide das lesões das raízes *Pratylenchus zaeae* Graham, 1951. **Nematologia Brasileira**, 12: 110-120. 1988.

OOSTENBRINK, R. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededeelingen der Landbouw-Hoogeschool**, v. 66, p. 1-46, 1966.

SEVERINO, J.J. **Levantamento e identificação de nematoides na cultura da cana-de-açúcar, na região noroeste do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá. 66 p. 2007.

SUNDARARAJ, P.; MEHTA, U. K. Influence of the lesion nematode, *Pratylenchus zae*, on yield and quality characters of two cultivars of sugarcane. **Nematologia Mediterranea**, v. 22, p. 65-67, 1994.

CAPITULO III: POTENCIAL DE RIZOBACTÉRIAS NA COLONIZAÇÃO RIZOSFÉRICA, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E MANEJO DE FITONEMATOIDES NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR.

1- INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas e das lesões radiculares são considerados os de maior importância econômica na cultura da cana-de-açúcar. Este fato se deve à soma de vários fatores que favorecem a multiplicação destes fitonematoides, entre estes estão, a falta de variedades resistentes, o ciclo de cultivo perene, alta polifagia e ampla distribuição geográfica, e, a baixa eficiência dos nematicidas, acarretando, dessa maneira, na diminuição da vida útil do canavial (DINARDO-MIRANDA, 2005; BARBOSA, 2012).

A grande preocupação com relação ao ataque dessas pragas são os danos causados as raízes dessa forma, o sistema radicular que fica debilitado, e não consegue suprir a demanda por nutrientes e água para a planta. Os sintomas nas raízes das plantas quando infectadas por *Meloidogyne* ocorre a formação de células multinucleadas sendo denominadas “células gigantes”, originando-se assim, as galhas. Já os sintomas causados pelos nematoides pertencentes ao gênero *Pratylenchus*, consistem em longas áreas necrosadas sendo primeiramente avermelhadas, escurecendo com o tempo. Esse sintoma é causado pelo dano no córtex da raiz, resultante da movimentação dos fitoparasitas no interior da mesma, principalmente, nas radículas (NOVARETTI et al., 1988; TIHOHOD, 1993; DINARDO-MIRANDA, 2005).

Devido à elevada gama de hospedeiros, o controle desses fitonematoides torna-se restrito, uma vez que a utilização de nematicidas nem sempre é eficiente. Com isso, buscam-se formas alternativas de manejo como o controle biológico, por exemplo. Sendo assim, a utilização de bactérias uma promissora opção, levando-se em conta que as mesmas podem colonizar o sistema radicular promovendo benefícios a planta, que seja na promoção do crescimento ou na redução da população do nematoide presente, sem prejudicar o ecossistema.

Essas bactérias podem ser encontradas no solo, rochas e também colonizando o sistema radicular de plantas. Quando possuem o poder de colonizar o sistema radicular recebem a denominação de rizobactérias, sendo essa colonização possível devido às secreções das raízes que são ricas em aminoácidos e carboidratos (SCHROTH, HANCOCK, 1982; SUSLOW, 1982; KLOEPPER et al., 1992).

Essas bactérias são descritas como Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Planta ou PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, pois além de seu poder biocontrolador de doenças, contribuem como biofertilizadoras, aumentando a disponibilidade de nutrientes, podendo ser fitoestimulantes, quando estimulam o crescimento da planta, ou ainda, rizorremediadoras, quando degradam poluentes orgânicos (SOMERS, VANDERLEYDEN, SRINIVASAN, 2004).

O controle biológico, promovido por rizobactérias, pode ocorrer de várias formas, através do parasitismo, da produção de metabólitos que interferem na reprodução, postura dos ovos e eclosão de juvenis, além de interferir na sobrevivência nos estádios iniciais de desenvolvimento dos mesmos, podendo ainda levar a morte indivíduos adultos (SIDDIQUI, MAHMOOD, 1999; ZUCKERMAN, JASSON, 1984).

Os efeitos causados aos nematoides estão ligados diretamente à produção de compostos tóxicos, que atuam como nematicidas ou nematostáticos, além da produção de enzimas que possuem ação sobre os ovos, como lipases (SANTIN, 2008), proteases (DUNNE et al., 2000) e quitinases (ZHANG, YUEN et al., 2000) que estão envolvidas no processo de degradação da parede do ovo.

Buscando eficiência no biocontrole, a grande maioria dos estudos está focado no isolamento de bactérias oriundas do solo e da rizosfera, encontrando-se poucas publicações quando se trata de microrganismos isolados de outros locais, como de rochas, por exemplo. No entanto, um ambiente desfavorável, como à rocha, pode oferecer materiais com características importantes quanto à resistência e sobrevivência em condições desfavoráveis, como a dessecação e a luz ultravioleta (HIRSCH et al., 2004). Além disso, esses microrganismos possuem a capacidade de degradar rochas, colaborando com o aumento de minerais disponíveis para a absorção pela planta (GADD, 1999; GORBUSHINA, 2007).

Atualmente a bactéria que vem recebendo maior atenção é a *Pasteuria penetrans*, a qual possui resultados favoráveis ao seu uso como forma de controle alternativo de fitonematoides. Todavia, sua forma de multiplicação ainda é difícil, necessitando de um hospedeiro vivo para esse processo, não sendo possível a sua realização em meio de cultura, dificultando, desta forma, a sua produção em larga escala.

Nas últimas décadas bactérias que possuam eficiência no controle de nematoides e com manejo simplificado estão sendo buscadas para suprir a demanda no controle dessas pragas. Araujo e Marchesi (2009) avaliando o uso de *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne* spp. em plantas de tomate, observaram efeito significativo na redução do número de juvenis e no desenvolvimento de massas de ovos, podendo isso ser atribuído a

paralização do ciclo ou redução da capacidade reprodutiva do parasita, além de ocorrer a transformação dos exsudatos radiculares em subprodutos pela ação dos microrganismos, podendo causar desorientação do nematoide no solo.

Pinho et al. (2008) em estudo avaliando o efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonizar raízes de tomateiro, observaram que as espécies *Acinetobacter johnsonii* (3 isolados), *Curtobacterium luteum*, *Bacillus pumilus* subg. B., *B. pumilus* (2 isolados), *B. aureus*, P11 (espécie não identificada), *Staphylococcus aureus*, *B. amyloliquefaciens* reduziram, ao mesmo tempo, o número de galhas, a massa de ovos e os ovos por grama de raiz. As reduções variaram de 14 a 58 % para número de galhas por grama de raiz, 28 a 77 % para número de massas por grama de raiz e de 15 a 55 % para número de ovos por grama de raiz. Além de colonizarem o sistema radicular do tomateiro.

Em estudos utilizando *Bacillus subtilis* no controle *Meloidogyne* sp. e na promoção do crescimento de plantas de tomate Araujo e Marchesi (2009), verificaram que *B. subtilis* promoveu o aumento da biomassa de parte aérea e reduziu a reprodução dos nematoides formadores de galhas. Em outro estudo Junior et al. (2010) avaliando a eficiência de rizobactérias microbiolizadas em sementes de arroz no controle de *Rhizoctonia solani*, *Meloidogyne graminicola* e para a promoção de crescimento de arroz relataram que o maior controle e promoção do crescimento foi alcançada pelas combinações de rizobactérias.

Considerando-se a grande diversidade de vida no solo e suas estreitas associações entre os diferentes grupos de micro-organismos, podendo-se observar interações sinérgicas e de predação ou parasitismo, não se deve ignorar o enorme potencial de biocontrole das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas sobre fitonematoides como opção eficaz para o manejo dessas pragas. Desta forma, este trabalho teve como objetivos: *i*) avaliar *in vitro* a capacidade de bactérias isoladas de rizosfera de figueira e de folhelhos pirobetuminosos quanto a solubilização de compostos e colonização radicular de plântulas de cana-de-açúcar, *ii*) verificar *in vitro* a ação de isolados de rizobactérias sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* e *iii*) Avaliar *in vivo* o potencial de rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado e constou de vários ensaios, descritos a seguir.

2.1- Origem, identificação, caracterização e manutenção dos isolados bacterianos.

Os 48 isolados bacterianos avaliados (Tabela 1 e 2) foram provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, sendo estes isolados da rizosfera de figueira e de folhelhos pirobetuminosos, os quais estão mantidos em glicerol 20% (v/v) em *freezer* a -20°C (MARIANO, SILVEIRA, 2005). Apenas cinco dos isolados de rizobactérias estavam identificados a nível de espécies (Tabela 1), sendo a maioria apenas codificados conforme a sua procedência como F e FC quando isolados de rizosfera de figueira e como XT e P quando isolados de folhelhos pirobetuminosos. Destes, 26 isolados foram caracterizados, em trabalho anterior conduzido por Wille (2013), quando a produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção de crescimento, através de testes de produção de quitinase (Q), produção de protease em leite (PL) e em gelatina (PG), produção de lipase em Tween 80 (L), produção de amônia (A) (Tabela 1) (WILLE, 2013).

Neste experimento inicialmente foi realizada a identificação das demais rizobactérias ao nível de espécie e a avaliação da capacidade de formação de novos compostos *in vitro*, para todos os isolados realizou-se testes de caracterização da parede celular através do teste de Gram (WILLE, 2013) e KOH 3% (RYU, 1940). A identificação dos isolados de rizobactérias ao nível de espécie, daqueles ainda não identificados, foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado. A caracterização molecular foi realizada através da extração do DNA genômico, onde as amostras foram submetidas à Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), para a amplificação da região 16S do gene rRNA. Sendo os produtos obtidos no PCR analisados em gel de agarose 2% e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). O produto purificado foi quantificado em eletroforese em gel de agarose 1% utilizando-se o marcador Low DNA Mass Ladder (INVITROGEN), realizando-se o sequenciamento para a identificação dos isolados (Tabela 1 e 2) (WILLE, 2013).

Tabela 1 – Identificação de bactérias isoladas de folhelhos pirobetuminosos (XT e P) e da rizosfera de figueiras (F), e sua capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole.

Isolados bacterianos	Identificação	Q	PL	PG	L	A	N° C.P.
XT02	Ni	-	+	-	+	+	3
P09	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	-	-	-	-	+	1
XT10	Ni	-	-	-	-	-	0
P10	Ni	-	-	+	+	-	2
XT11	Ni	-	+	-	-	-	1
P12	<i>Janibacter terrae</i>	-	-	-	+	+	1
XT16	Ni	-	-	-	+	+	2
P17	Ni	-	-	-	-	-	0
P18	<i>Gordonia westfalica</i>	-	-	+	-	-	1
XT19	Ni	-	-	-	-	+	1
XT21	Ni	-	-	-	-	-	0
XT23	Ni	-	-	-	-	+	1
XT24	Ni	-	-	+	+	+	3
XT26	Ni	-	+	+	+	+	4
XT33	Ni	-	-	-	-	-	0
XT35	Ni	-	-	-	-	+	1
XT37	Ni	-	+	-	+	+	3
XT38	Ni	-	-	-	-	+	1
XT39	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	+	1
XT40	Ni	-	-	+	-	+	2
XT41	Ni	-	-	-	-	-	0
XT43	Ni	-	-	-	-	-	0
XT45	Ni	-	-	-	-	-	0
XT50	Ni	-	-	-	-	-	0
F74	Ni	-	+	+	-	+	3
F76	<i>Streptomyces</i> sp.	-	+	+	+	-	3

Não identificado (Ni), produção de quitinasas (Q), produção de proteases em leite de litmus (PL), produção de proteases em gelatina (PG), produção de lipases em Tween 80 (L), produção de amônia (A), produção do composto (+), não produz o composto (-), Numero total de compostos produzido (N° C.P) Tabela modificada e adaptada de Wille (2013).

2.2- Avaliação de isolados bacterianos quanto a capacidade de solubilização de compostos relacionados à promoção de crescimento de plantas.

Para avaliar uma possível capacidade de solubilização de alguns compostos presentes no ambiente, como potássio e fosfato. Nesse sentido, foram conduzidos ensaios *in vitro* para avaliar a capacidade dos 48 isolados bacterianos em solubilizar esses nutrientes. Esses

isolados passaram por diluição seriada de 10^{-4} , 10^{-5} 10^{-6} , repicados para tubos de ensaio e mantidos na coleção.

2.2.1- Solubilização de fosfato

Para a avaliação da capacidade de solubilização de fosfato, os isolados bacterianos (Tabela 1 e 2) foram repicados da coleção para o meio de cultura específico NBRIP (NAUTIYAL et al., 1999), e, incubadas a 25°C por sete dias. Após esse período, a solubilização de fosfatos foi verificada pela formação de um halo claro ao redor das colônias.

2.2.2- Solubilização de potássio

Para avaliar a solubilização de potássio, os mesmos isolados bacterianos, citados anteriormente, foram repicadas para o meio de Aleksandrov e incubadas a 37 °C por uma semana (SUGUMARAN, JANARTHAM, 2007).

Para a avaliação, a partir de 24h inoculação foi realizada a observação da presença do halo claro em torno da colônia, caracterizando a solubilização de potássio.

2.3- Avaliação *in vitro* da colonização do sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar microbiolizadas com bactérias.

Para a realização deste ensaio, foram utilizados 48 isolados de bactérias pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado que foram obtidas a partir do isolamento de folhelhos pirobetuminosos e da rizosfera de figueira (*Ficus carica*) (Tabela 1 e 2).

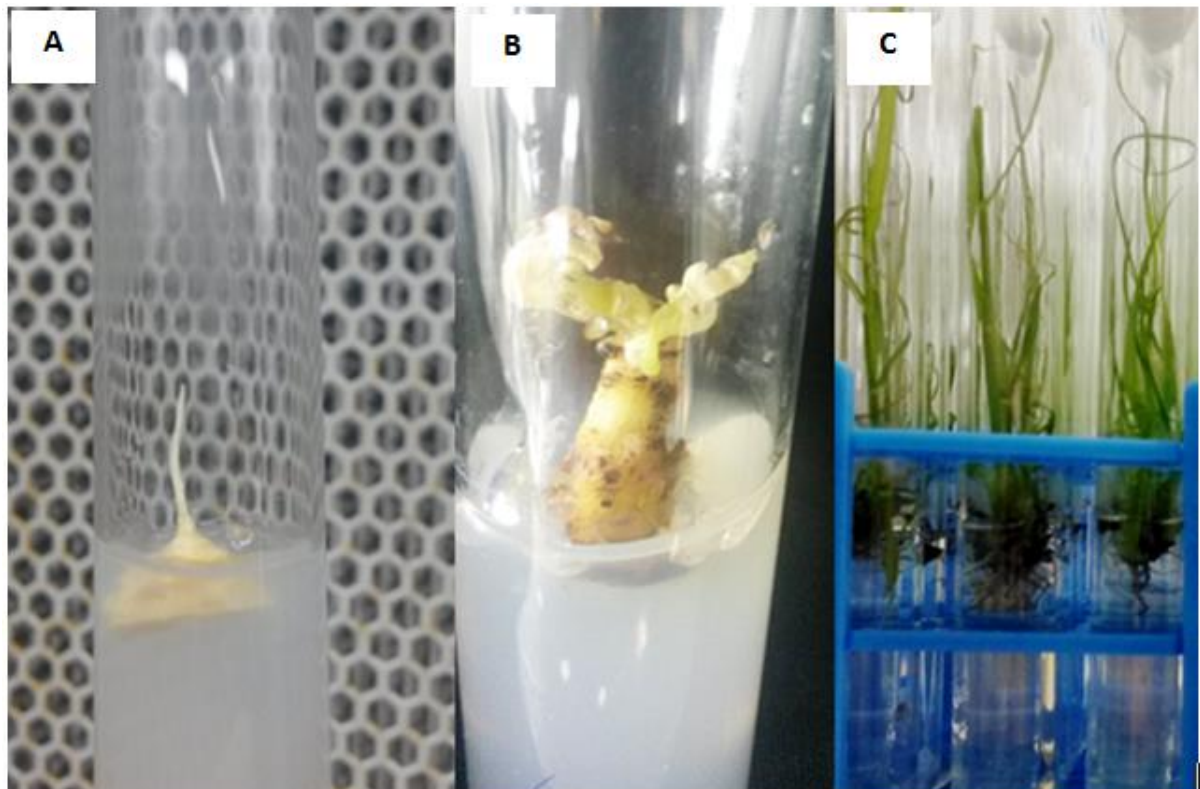
Primeiramente, as bactérias foram repicadas para placas de Petri contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970) e incubadas a 28°C por 48 horas. Após esse período, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, foi realizada uma suspensão de cada isolado, contendo solução salina (NaCl 0,85), sendo então calibradas em espectrofotômetro, para absorvância de 540 nanômetros.

As plântulas de cana-de-açúcar, do genótipo RB008347 foram obtidas a partir da técnica de cultura de tecidos, que consistiu na retirada de palmitos de colmos do campo, em laboratório, os quais passaram por desinfestação, sendo imersos primeiramente por dois minutos em álcool 70%, e, após, 15 min em hipoclorito de sódio, e, então realizada a tríplice lavagem em água destilada esterilizada para a retirada de resíduos. Os meristemas foram

retirados com o auxílio de bisturi e pinças os quais foram imersos em ácido cítrico a 1,5% para evitar a oxidação. Posteriormente, transferidos para tubos de ensaio (Figura 1) com o meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) adicionado de 0,2 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de cinetina (LEE, 1987), sendo esses, mantidos por 5 dias no escuro a 25 ± 2°C, após esse período transferidos para fotoperíodo de 16h.

Após dez dias, devido à oxidação fenológica, os explantes foram trocados para um novo meio idêntico ao utilizado permanecendo por mais 15 dias, para posteriormente proceder-se a primeira repicagem dos explantes. Entretanto, objetivando-se uma alta taxa de multiplicação desses explantes, realizaram-se quatro repicagens, uma a cada 30 dias (DUTRA et al., 2011).

Figura 1 – Produção de plântulas de cana-de-açúcar RB008347 a partir da cultura de tecido: meristema apical (A), meristema apical com algumas semanas (B) e plantulas prontas para a microbiolização (C).



Decorrido 30 dias da última repicagem, as plântulas foram retiradas dos tubos e tiveram suas raízes lavadas por três vezes consecutivas em água destilada esterilizada para retirar resquícios de meio de cultivo ainda presentes nas raízes. Para a microbiolização, as raízes foram imersas em suspensão bacteriana por 30 minutos. Passado esse intervalo de

tempo, as plântulas foram transferidas para o meio Gelrite® (Sigma) a 1,5%, o qual não teve adição de fontes de carbono e nitrogênio. Sendo utilizadas 10 repetições para cada tratamento bacteriano, além de um tratamento testemunha onde as raízes foram imersa somente em água salina.

A avaliação da colonização foi realizada aos oito dias após a microbiolização, a partir de observação da presença ou não de turvação do meio ao redor das raízes, atribuindo notas de 0 a 3 de acordo com a escala de Habe e Uesugi (2000) onde 0 = nenhuma colonização, 1 = colonização até 1/3 das raízes, 2 = colonização de 1/3 até 2/3 das raízes e 3 = colonização acima de 2/3 até a totalidade das raízes (Anexo A).

Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA e ao teste de agrupamento de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Foram selecionadas os isolados bacterianos com maior potencial de colonização *in vitro* para utilização nos ensaios *in vivo* subsequentes onde observou-se o potencial dessas rizobactérias selecionadas como promotoras do crescimento de mudas microbiolizadas e no biocontrole de fitonematoides em cana-de-açúcar.

2.4- Potencial de isolados bacterianos selecionados *in vitro* na produção de mudas de cana-de-açúcar.

Para a realização deste experimento utilizou-se as bactérias XT56, P17, XT51, XT33, XT23, XT39, XT26, XT37, as quais foram pré-selecionadas no ensaio de colonização radicular, sendo que a preparação da suspensão bacteriana de cada isolado seguiu a metodologia descrita no item 2.3.

Após a preparação da suspensão bacteriana procedeu-se a microbiolização das mudas, adicionando-se 30 ml de cada isolado por tubete, os quais continham uma muda de cana-de-açúcar cultivar RB008347 obtida através de cultura de tecido (Item 2.3), utilizando-se 5 repetições por tratamento. Após 15 dias da realização da microbiolização das mudas foram avaliados os seguintes parâmetros vegetativos: altura, peso de parte aérea, peso de raiz, clorofila A e B e clorofila total.

Os resultados foram submetidos à ANOVA, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade do erro pelo programa estatístico SASM- Agri.

2.5- Efeito nematicida e ovicida *in vitro* dos isolados de rizobactérias sobre juvenis de segundo estágio e ovos de *M. javanica*.

Massas de ovos foram retiradas das galhas de raízes de tomateiro cultivar Santa Cruz, as quais fazem parte da coleção nematológica do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado/RS. Parte desta suspensão de ovos foi utilizada para condução do ensaio da eclosão e, o restante foi depositado em funil de Baermann para a eclosão dos juvenis que foram utilizados após 24h (BAERMANN, 1917) para estabelecimento do ensaio da mortalidade.

Para a avaliação da eclosão uma alíquota de 30 µL de suspensão contendo 30 ovos de *M. javanica* foi colocada em uma cavidade de placa de microtitulação (tipo ELISA), imersos em 20 µL de água destilada esterilizada, nos quais foi depositado, a seguir, 50 µL da suspensão bacteriana, sendo os isolados utilizados XT10, XT 21, XT 23, XT 37, XT 38 e XT39, individualmente, preparadas as suspensões conforme metodologia descrita no item 2.3. Como testemunha, cavidades individuais de placas de microtitulação contendo 30 ovos de *M. javanica* imersos em 20 µL de água destilada esterilizada e 50 µL de solução salina (NaCl 0,85%), utilizando-se quatro repetições para cada tratamento. Em seguida, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas no escuro, a 26°C, sendo realizada a avaliação no 12º dia, determinando-se o número, e percentual de J2 eclodidos.

Para a avaliação da mortalidade, juvenis de segundo estágio (J2) foram depositados em frequência média de 30 J2 de *M. javanica* por cavidades da placa de microtitulação, a qual já continha 20 µL de água destilada esterilizada. Após, foram preparadas as suspensões bacterianas dos mesmos isolados, as quais foram preparadas conforme metodologia descrita no item 2.3. Esta suspensão foi então, adicionada, individualmente, no volume de 50 µL, em cada cavidade contendo a suspensão de nematoides. Como testemunha, utilizou-se uma suspensão de aproximadamente 30 J2 do nematoide, imersos em 20 µL de água destilada esterilizada e 50 µL de solução salina (NaCl 0,85%), adicionada em cada cavidade da placa.

Em seguida, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas no escuro, a 26°C, durante 24 horas. Para avaliação do efeito nematicida foram adicionados em cada orifício da placa, 10 µL de solução NaOH 1N (CHEN, DICKSON, 2000) e realizada a contagem do número de J2 mortos em cada cavidade, sob microscópio estereoscópico, considerando-se como mortos os J2 que permaneceram com o corpo completamente distendido durante 1 minuto após a adição de NaOH. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e cada tratamento conteve quatro repetições.

A seguir, os dados da inibição da eclosão, e do percentual de mortalidade, obtidos em cada ensaio foram submetidos à NOVA, sendo as médias comparadas entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade do erro pelo programa estatístico SASM- Agri.

2.6- Potencial de rizobactérias na promoção do crescimento e no biocontrole de *Meloidogyne javanica* em cana-de-açúcar.

Este ensaio foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial de rizobactérias no biocontrole do nematoide-das-galhas, *Meloidogyne javanica*, em plantas de cana-de-açúcar, em casa de vegetação, obtidas pela multiplicação de mudas em tubetes de 150 cm³ contendo substrato esterilizado. Decorrido 20 dias do plantio dos mini-tolete, quando as canas estavam emergidas procedeu-se a microbiolização das mudas com a deposição de 30 ml de solução bacteriana dos seis isolados selecionados, XT10, XT 21, XT 23, XT 37, XT 38 e XT39, nos tubetes contendo substrato. Transcorridos 10 dias da microbiolização, as plantas foram inoculadas com 5000 ovos + J₂ de *M. javanica*, utilizando-se seis repetições por tratamento.

Como testemunhas, utilizou-se plantas de cana-de-açúcar da mesma variedade, microbiolizadas apenas com solução salina, e inoculadas com o mesmo nível de inóculo do nematoide além de plantas sem a inoculação do nematoide.

Após 90 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas quanto ao peso da biomassa fresca da parte aérea e do sistema radicular, diâmetro do colmo no primeiro entre nó, altura da planta, número de galhas nas raízes e fator de reprodução do nematoide (FR = população final/população inicial) segundo Oostembrink (1966).

A seguir as médias obtidas nas diferentes variáveis, nos diferentes tratamentos, foram submetidos à ANOVA, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade do erro pelo programa estatístico SASM- Agri.

2.7- Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar infectadas com o *Pratylenchus zaeae*.

Para a condução deste ensaio, utilizou-se mudas, de cana-de-açúcar genótipo RB008347, obtidas através de cultura de tecido no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado/RS. Conforme determinado no item 2.3 a seguir, as mudas foram transplantadas para tubetes contendo 150 cm³ de substrato esterilizado. O inóculo de *Pratylenchus zaeae* utilizado foi obtido a partir do processamento de raízes de plantas de sorgo

(*Sorghum bicolor*) cultivar BRS 506, pertencentes à coleção nematológica da Embrapa Clima Temperado/RS, conforme método Coolen & D’Herd (1972).

Decorrido 15 dias do transplante, as mudas de cana-de-açúcar foram microbiolizadas com os inóculos bacterianos XT56, P17, XT51, XT33, XT23, XT39, XT26, XT37. Decorridos 10 dias da microbiolização, realizou-se a inoculação de cada planta com 1000 espécimes de *Pratylenchus zae*, utilizando-se seis repetições. Como testemunhas, utilizou-se plantas de cana-de-açúcar da mesma variedade, microbiolizadas apenas com solução salina, e inoculadas com o mesmo nível de inóculo do nematoide e também plantas sem a inoculação do nematoide.

Decorrido 30 dias da inoculação avaliou-se diâmetro do colmo, altura de planta e teor clorofila, sendo as avaliações de biocontrole realizadas a posteriori. A seguir os valores obtidos nas diferentes variáveis, nos diferentes tratamentos, foram submetidos à ANOVA, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade do erro pelo programa estatístico SASM- Agri.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação e caracterização das rizobactérias e avaliação da capacidade de solubilização

De acordo com os resultados das tabelas 2 juntamente com as bactérias da tabela 1, 64,58% dos isolados bacterianos foram identificados, caracterizaram uma grande diversidade de espécies de rizobactérias isoladas de folhelhos pirobetuminosos e rizosfera de figueira, com predominância do gênero *Pseudomonas* (32,26%). Essa elevada ocorrência pode estar ligada ao fato deste gênero ser encontrado nos mais diferentes ambientes, (NEHL et al., 1996; MISKO, GERMIDA, 2002) bem como estar presentes em todos os solos agrícolas, e serem adaptáveis para o crescimento na rizosfera (CAMPOS, 2010), podendo as mesmas, estarem frequentemente associadas a promoção do crescimento e ao controle biológico de fitonematoides (KLOEPPER, 1993). Segundo Mariano et al. (2004) as rizobactérias que apresentam maior potencialidade e praticabilidade de uso na agricultura são as espécies : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*, *Agrobacterium*, e *Enterobacter* entre outras

Dos 48 isolados bacterianos utilizados no presente trabalho 26 deles foram estudados por Wille (2013) (Tabela 1) sendo avaliados quanto a capacidade de produzir compostos

bioquímicos, sendo eles: produção de quitinases, produção de proteases em leite de litmus, produção de proteases em gelatina, produção de lipases em Tween 80, produção de amônia. E no presente trabalho todos os isolados foram avaliados quanto a capacidade de solubilizar fosfato e potássio (Tabela 2). Sendo então dois isolados XT 26 e XT 37 considerados promissores, quanto à produção de substâncias relacionadas ao biocontrole de fitonematoides, pois foram capazes de produzir quatro compostos (proteases em gelatina, lipases, amônia e fosfatase) dos seis compostos avaliados (Tabela 1 e 2). Nenhum dos isolados foi capaz de produzir todos os seis compostos testados, sendo que, nem um degradou quitina e apenas XT 57 é capaz de solubilizar potássio (Tabela 2).

A ação benéfica das rizobactérias, também, pode ser indireta por meio do controle de micro-organismos patogênicos. Quando a planta está sendo infectada por um patógeno, as rizobactérias podem atuar como agentes de controle biológico, através da produção de diferentes metabólitos bacterianos que afetam o patógeno, e diretamente, tais como antibióticos e enzimas que degradam a parede celular (ENEBAK et al., 1998). A produção de enzimas líticas por rizobactérias está associada, principalmente, a inibição da eclosão dos nematoides, pois atua nos componentes estruturais dos ovos que são vitais para o desenvolvimento do embrião (WILLE, 2013; SPIEGEL et al., 1990; ALVES et al., 2011). A amônia também é um fator importante devido a sua toxicidade aos nematoides (RODRIGUÉZ-KÁBANA et al., 1987), sendo este composto observado em quatorze bactérias (Tabela 1)

O tegumento da casca dos ovos de nematoides funciona como uma barreira que confere proteção contra agentes químicos e biológicos. Essa barreira é composta por três camadas: camada vitelínica, quitinosa e lipídica (BIRD, McCLURE, 1976). Dessa forma, devido a sua importância, a sua degradação é uma das principais formas de controle sendo um mecanismo desejável para agentes de controle biológicos que parasitam ovos. Fungos (LOPEZ-LLORCA, ROBERTSON, 1992; TIKHONOV et al., 2002; KHAN et al., 2004) e bactérias (MERCER et al., 1992) são capazes de produzir estas enzimas. Embora nenhum dos isolado bacterianos testados por Wille (2013) tenha produzido quitinase, a produção de proteases foi verificada em cerca de 38% dos isolados (Tabela 1). A protease é uma enzima importante, pois a camada vitelina, primeira barreira de proteção do ovo, possui elevada quantidade de proteína além de que toda estrutura da casca do ovo é composta por pelo menos 40% de proteína (WHARTON, 1980). Colaborando com este resultado Arduim (2006) conduzindo trabalho de biocontrole de *Meloidogyne incognita* utilizando isolados bacterianos

oriundos de raízes de figueira, constatou que está foi a enzima mais frequente entre as bactérias.

Segundo Wei et al. (2009), a capacidade de produzir proteases é um indicativo suficiente para recrutamento de biocontroladores. Ainda em seus estudos, os autores verificaram correlação positiva altamente significativa entre a produção de proteases e o biocontrole de fitonematoides em experimentos conduzidos em casa de vegetação, porém não foi constatada correlação entre produção de quitina e biocontrole *in vivo*.

Tabela 2 – Caracterização molecular de isolados bacterianos provenientes de folhelhos pirobetuminosos (XT, P), rizosfera de figueira (F, FC) e sua capacidade de produzir compostos relacionados à promoção do crescimento de plantas.

Isolados bacterianos	Identificação	P	K	Nº C.P.
XT02	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	0
P09	<i>Pseudomonas denitrificans</i> *	-	-	0
XT10	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	0
P10	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-	1
XT11	<i>Exiguobacterium acetylium</i>	-	-	0
P12	<i>Janibacter terrae</i> *	-	-	0
XT14	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	-	1
XT16	Ni	+	-	1
P17	<i>Microbacterium sp.</i>	-	-	0
P18	<i>Gordonia westfalica</i> *	+	-	1
XT19	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	0
XT20	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	-	-	0
XT21	<i>Arthrobacter pascens</i>	-	-	0
XT22	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	-	-	0
XT23	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	0
XT24	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	-	-	0
XT26	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	-	0
XT33	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	0
XT35	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-	1
XT36	<i>Exiguobacterium acetylium</i>	-	-	0
XT37	Ni	+	-	1
XT38	<i>Exiguobacterium acetylium</i>	-	-	1
XT39	<i>Micrococcus luteus</i> *	+	-	1
XT40	<i>Arthrobacter humicola</i>	-	-	0
XT41	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	-	0
XT43	<i>Uncultured pseudomonas</i>	-	-	0
XT45	<i>Arthrobacter oxydans</i>	+	-	1
XT50	<i>Pseudomonas gessardii</i>	-	-	0
XT51	Ni	-	-	0
XT52	Ni	-	-	0
XT53	Ni	-	-	0
XT54	Ni	-	-	0
XT55	Ni	-	-	0
XT56	Ni	-	-	0

Continua

Continua

Isolados bacterianos	Identificação	P	K	N° C.P.
XT57	Ni	-	+	1
XT58	Ni	-	-	0
XT59	Ni	-	-	0
XT61	Ni	-	-	0
XT62	Ni	-	-	0
XT63	Ni	-	-	0
XT64	Ni	-	-	0
XT66	Ni	-	-	0
XT68	Ni	-	-	0
XT69	Ni	-	-	0
F74	Ni	-	-	0
FC75	<i>Pseudomonas koreensis</i>	-	-	0
F76	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-	0
FC78	<i>Pseudomonas stutzerin</i>	-	-	0

Não identificado (Ni), solubilização de fosfato (P), solubilização de potássio (K) produção do composto (+), não produz o composto (-), Numero total de compostos produzido (N° C.P) *rizobactérias identificada por Wille (2013).

Além de algumas bactérias apresentarem potencial para o controle biológico, uma vez presentes na rizosfera das plantas, podem promover o aumento do crescimento das mesmas. Tal efeito pode ser atribuído à capacidade de solubilizar nutrientes que estão presentes no local e/ou induzir a produção de hormônios pela planta, uma vez as plantas estando bem nutridas estarão mais resistentes ao ataque de pragas (LUZ, 1996; ENEBAK et al., 1998)

A capacidade de solubilizar fosfato é de grande valia uma vez que esse mineral está envolvido no metabolismo da planta como na transferência de energia da célula, respiração e fotossíntese, sendo ainda fator limitante no desenvolvimento inicial das plantas e determinante para a produtividade. Souchie et al. (2005) constataram efeito benéfico na promoção do crescimento de *Mimosa caesalpinifolia* (Sabiá) e *Acacia holosericea* (Acacia-mimosa) inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato. Semelhantemente, Chabot et al. (1996) avaliando microrganismos solubilizadores de fosfato, como *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminosarum*, verificaram sua capacidade de promover crescimento em plantas alface e milho, proporcionando aumentos na absorção de fosfato da ordem de 6 e 8 %, respectivamente.

Semelhantemente ao fosforo, o potássio também está ligado a diretamente processos metabólicos, como a fotossíntese, síntese de proteínas e carboidratos, além de ter influencia no balanço hídrico e no crescimento dos meristemas (STRAATEN, 2007).

A produção de vários compostos pode refletir na capacidade de biocontrole dos isolados, mas sabe-se que outros mecanismos de biocontrole podem estar presentes,

justificando a importância de avaliar os isolados quanto a sua capacidade de colonização radicular e efeito sobre a mortalidade e eclosão dos nematoides.

3.2 Avaliação *in vitro* da colonização do sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar microbiolizadas com bactérias

Todos os 48 isolados testados foram capazes de colonizar o sistema radícula. Sendo as rizobactérias XT38, XT 10, XT56, P17, XT51, XT33, XT23, XT39, XT26, XT63, XT53, XT52 e XT37 (Tabela 3), as que formaram o grupo de isolados que se destacaram na colonização do sistema radicular das plântulas de cana-de-açúcar, obtendo nota máxima ou muito próxima da máxima (2,6 a 3,0) conforme escala de Habe e Uesugi (2000) e diferiram estatisticamente das demais.

O método de seleção *in vitro* é um método simples para identificar a capacidade da bactéria de colonizar o sistema radicular, sendo muito utilizado principalmente pela microbiolização de sementes (SOTTERO, 2006). Porém, em casos em que a utilização de sementes não é possível se faz uso de plântulas (LOPES, 2011), como neste caso da cana-de-açúcar, que utilizou-se plântulas produzidas em cultura de tecidos e posteriormente microbiolizadas.

Tabela 3 – Intensidade de colonização radicular *in vitro* de plântulas de cana-de-açúcar RB00834 por isolados bacterianos de folhelhos pirobetuminosos (XT, P) e rizosfera de figueira (F, FC) aos oito dias após a microbiolização.

Tratamento	Intensidade ¹	Tratamento	Intensidade ¹
XT38	3 a*	P18	2 b
XT10	3 a	XT11	1,88 b
XT56	3 a	XT64	1,9 b
P17	3 a	F76	1,85 b
XT51	3 a	P12	1,85 b
XT33	2,9 a	XT22	1,7 b
XT23	2,88 a	XT41	1,6 b
XT39	2,87 a	XT66	1,55 c
XT26	2,8 a	XT59	1,5 c
XT63	2,6 a	XT19	1,6 c
XT53	2,6 a	XT40	1,5 c
XT52	2,6 a	XT61	1,4 c
XT37	2,6 a	XT45	1,33 c
XT69	2,3 b	XT36	1,33 c
XT68	2,3 b	P10	1,3 c

Continua

Continua

Tratamento	Intensidade ¹	Tratamento	Intensidade ¹
XT24	2,5 b	XT02	1,3 c
XT43	2,25 b	XT55	1 d
XT21	2,25 b	XT16	1 d
XT50	2,2 b	FC78	1,12 d
XT35	2,2 b	FC75	1 d
XT14	2,12 b	XT54	0,77 d
XT62	2,11 b	P09	0,71 e
XT58	2,1 b	F74	0,25 f
XT20	2 b	Salina	0,0 f
XT57	2 b		
			CV % 20,68

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. ¹Escala de Habe e Uesugi (2000)

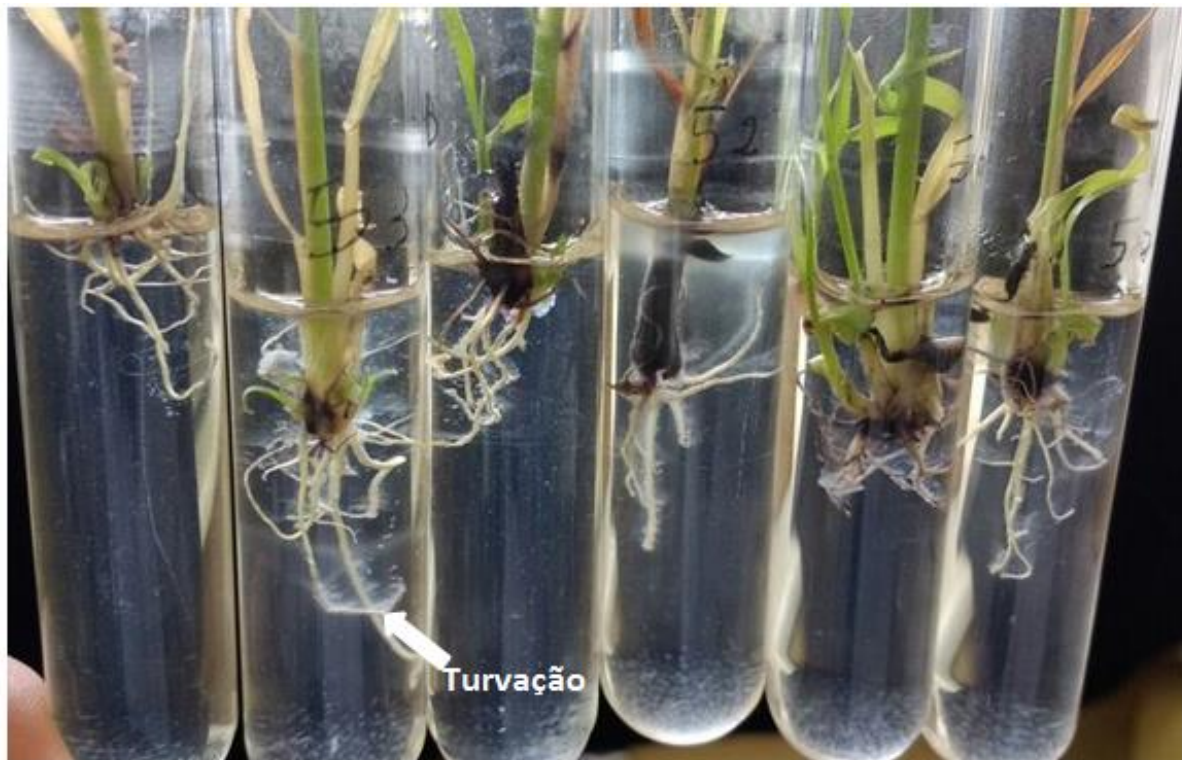
A avaliação *in vitro* da capacidade e intensidade de colonização radicular (Figura 2), proporcionam uma forma rápida e eficiente de visualização das bactérias que possuem a capacidade de associação com as raízes, e assim tendo grandes chances de atuarem como possíveis agentes de controle biológico e/ou promotoras do crescimento de plantas. Este método é uma forma de pré-selecionar isolados, tendo como característica a capacidade de avaliar uma elevada quantidade de bactérias em um curto intervalo de tempo. Sottero (2006) ao testarem a colonização de 64 bactérias em alface, verificou que apenas oito isolados colonizaram o sistema radicular, além de haver também ter observado diferenças nos locais preferencias de colonização, podendo ser na região do colo ou na raiz.

Lopes (2011) avaliando o potencial de rizobactérias na colonização de explantes de bananeira “prata anã” constatou ausência de colonização do sistema radicular, havendo colonização apenas na região do rizoma das mudas, além de ter sido constatada a morte de plantas em alguns isolados sendo eles *Paenibacillus lentimorbus* – 17, *P. lentimorbus*-24, *P. lentimorbus*-69, *B. punilus* – 60, *B. subtilis*-34 e *Bacillus* sp.-34. De acordo com o autor isso sendo atribuído a maior concentração de hormônios do crescimento presentes endogenamente e no meio de cultura para estimular o crescimento além das bactérias também produzirem o hormônio.

O método de colonização radicular *in vitro* pode ser considerado uma importante ferramenta para a seleção de agentes benéficos para as plantas, pois a rizosfera é o ambiente ideal para o desenvolvimento de microrganismos, sendo que essa colonização pode trazer benefícios no crescimento de planta, controle de fitopatógenos entre outras vantagens (MOTTA, 2012; COELHO et al., 2007). No entanto, a colonização radicular *in vitro* não é

garantia que estas bactérias promoverão crescimento e/ou que possuam a capacidade de controlar patógenos.

Figura 2 – Colonização radicular de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB008347 microbiolizadas com bactérias, aos oito dias após a microbiolização. Frederico Westphalen/RS, 2017.



3.3 Potencial de isolados bacterianos selecionados *in vitro* na produção de mudas de cana-de-açúcar

Neste ensaio buscou-se avaliar o efeito das rizobactérias sobre o crescimento, desenvolvimento e produção de mudas de cana-de-açúcar. Para o parâmetro altura, exceto o isolado XT 56, todos os tratamentos proporcionaram maiores valores comparados a testemunha não microbiolizada (Tabela 4).

Nas variáveis massa fresca de parte aérea e peso de raiz, a maioria dos isolados proporcionaram incremento de tais variáveis diferindo estatisticamente da testemunha (Tabela 4). Semelhantemente, Girio et al. (2015) em trabalho avaliando isolados de bactérias sobre a formação de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, observaram que todos os tratamentos inoculados com bactérias apresentaram índice de velocidade de brotação superior em relação

aos demais. De acordo com os autores isto é devido a capacidade que algumas bactérias possuem de sintetizar diferentes fitorreguladores de crescimento como o etileno, podendo favorecer as brotações.

Colaborando com isso Lopes (2011) avaliando o efeito de rizobactérias do gênero *Bacillus* no desenvolvimento de explantes de bananeira “Prata-anã” também verificou efeito significativo dos isolados para os parâmetros de altura e peso de matéria seca de parte aérea, porem não apresentando o mesmo efeito para comprimento de raiz, sendo esse resultado devido provavelmente à capacidade que essa bactéria tem de produzir hormônios como auxinas e giberelinas. De mesma forma, Cardoso (2009) em seus estudos avaliando os efeitos de *Bacillus subtilis* observou o aumento significativo da altura e massa seca de parte aérea, confirmando a ação de promoção do crescimento.

Assim, das bactérias selecionadas *in vitro* que foram inoculadas nas mudas de cana, observa-se que, quanto aos parâmetros de crescimento, as bactérias XT37, XT23, XT39, XT33, P17 e XT26 proporcionaram incremento na altura, massa fresca de parte aérea e massa fresca de raiz (Tabela 4).

Tabela 4 – Potencial de isolados bacterianos na promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar quanto aos parâmetros de altura, massa fresca de parte aérea (MFPA), peso de raiz (P RZ), clorofila A (Clor A), Clorofila B (Clor B) e clorofila total (Clor T).

Tratamento	Altura	MFPA	P RZ	Clor A	Clor B	Clor T
XT37	78 a*	2,62 a	1,29 a	463,64 a	92 ab	555,64 ab
XT23	75,4 a	2,51 a	1,40 a	372,96 ab	84,04 ab	457 ab
XT39	73,8 a	2,66 a	1,34 a	383,88 ab	82,32 ab	466,20 ab
XT33	70,8 a	2,32 a	1,60 a	317,88 b	83,28 ab	401,16 b
P17	70 a	2,73 a	1,31 a	367 ab	83,24 ab	450,24 ab
XT26	68,2 a	2,68 a	1,56 a	361,12 ab	74,44 b	435,56 b
XT51	69,8 a	2,25 a	1,05 ab	499,56 a	100,48 a	600,04 a

Continua

Continua

Tratamento	Altura	MFPA	P RZ	Clor A	Clor B	Clor T
XT56	53,60 b	2,60 a	1,74 a	361,12 ab	83,24 ab	496,56 ab
TAS	45,80 b	1,01 b	0,53 b	184,08c	46,20 c	230,28 c
CV %	11,93	22,89	37,49	25,95	19,51	24,45

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Testemunha com água salina (TAS)

Com relação aos teores de clorofila, embora tenha-se observado comportamentos diferenciados entre os tratamentos, todos os tratamentos com a presença de rizobactérias proporcionaram teores superiores de clorofila em relação à testemunha, sem bactéria, em todos os tipos de clorofila avaliados (Tabela 4). Cabe ainda salientar o fato que o tratamento XT 51 apresentou os maiores valores de clorofila A, B e total, podendo ser considerado como promotor de maior eficiência fotossintética, o que a longo prazo pode ser benéfico para a planta considerando o acúmulo de reservas no colmo (BOLOGNA-CAMPBELL 2007). Ainda segundo o autor, a redução da síntese da clorofila e aminoácidos essenciais reflete diretamente no desenvolvimento e rendimento da cultura da cana-de-açúcar. De acordo com Martins e Galo (2015) os processos fisiológicos associados ao desenvolvimento vegetal são influenciados pelos níveis de clorofila A e B, carotenoides, xantofila e antocianinas, que provocam a absorção da radiação eletromagnética.

De forma geral, pode-se considerar que os tratamentos bacterianos considerando-se as variáveis em conjunto, demonstraram que estas rizobactérias possuem grande influência sobre o desenvolvimento vegetal de plantas de cana-de-açúcar.

3.4 Efeito nematicida e ovicida *in vitro* dos isolados de rizobactérias sobre juvenis de segundo estágio e ovos de *M. javanica*

Observando-se os resultados apresentados na tabela 5, é possível notar diferenças no efeito que cada bactéria tem sobre *M. javanica*, isto pode ser atribuído aos compostos que cada bactéria produz, e em que fase do desenvolvimento do nematoide estes compostos agem, podendo interferir tanto sobre ovo como na fase de juvenil/adulto. Neste mesmo sentido Wille (2013) em seus estudos avaliando diferentes isolados bacterianos sobre eclosão e mortalidade de *M. incognita* encontrou diferenças na ação dos isolados, onde os que promoveram a maior inibição da eclosão não foram os mesmos que apresentaram o maior potencial nematicida.

Tabela 5– Percentagem da inibição da eclosão e mortalidade *in vitro* de juvenis de 2° estágio de *M. javanica* submetidos ao tratamento de seis isolados bacterianos.

Tratamento	Inibição eclosão¹ %	Mortalidade² J2 %
XT21	61,25 a*	1,25 bc
XT37	54,13 ab	0 c
XT23	51,08 ab	0 c
XT39	46,00 bc	2,38 bc
XT38	39,15 cd	4,80 b
XT10	20,60 e	84,93 a
As	34,05 d	0,50 c
CV%	17,18	20,72

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Água salina(As). ¹Avaliação 12 dias após estabelecimento do tratamento. ²Avaliação 24h após o estabelecimento dos tratamentos.

Embora a maioria das bactérias tenham promovido redução da eclosão, os isolados XT21, XT37 e XT23, com 61,25, 54,13 e 51,08%, respectivamente, resultaram em maior atividade ovicida (Tabela 5). Todavia, no teste de mortalidade apenas o isolado XT 10 apresentou elevada atividade nematicida, (84,93%) sobre os juvenis de segundo estágio de *M. javanica* (Tabela 5), deixando evidente que os compostos produzidos por cada bactéria possuem um efeito e um modo de ação diferente, interferindo em fases distintas do ciclo de vida.

Colaborando com estes resultados, vários trabalhos tem relatado a atividade antagonista de rizobactérias a *M. javanica*. Khan et al. (2010) avaliando *in vitro* 10 isolados de *Bacillus thuringiensis* em uma concentração de 50%, constatou a inibição da eclosão de 100% dos J2 para os isolados BT-10, BT-14, BT-16 e BT-64 mesmo após 96h da aplicação do tratamento, em relação ao efeito sobre a mortalidade J2 de *M. Javanica*, após 24h também chegou a 100% para os isolados BT-16 e BT-64 . Lopes (2011) também avaliando a eficiência de quatro isolados de *Bacillus* sp. sobre J2 de *M. javanica*, verificou resultados de 100% para um dos isolados. Alves et al. (2011) ao avaliar a ação de 20 isolados de rizobactérias sobre a eclosão e a motilidade *in vitro* de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, observaram que nenhum dos isolados avaliados influenciaram a eclosão de *M. incognita*, entretanto para *M. javanica*, os isolados FCAV 8 e FCAV 10 proporcionaram pronunciada ação ovicida.

Das rizobactérias que apresentaram maior inibição da eclosão, o isolado XT 37 (Ni) foi uma das que mais se destacaram na produção de compostos envolvidos no controle

biológico de nematoides, produzindo 4 dos 6 compostos mencionados (Tabela 1 e 2) e também elevado índice de colonização radicular (Tabela 3), justificando seu potencial ovicida, entretanto, esses compostos não demonstraram efeito sobre os juvenis (Tabela 5). As demais bactérias utilizadas neste estudo apresentaram bom desempenho sobre a inibição da eclosão, apesar de não produzirem nenhum composto (XT 21) ou apenas um dos compostos estudados (XT 23), sinalizando a importância de estudos para a identificação de outros mecanismos de controle com compostos tóxicos aos nematoides (SAMAC, KINDEL, 2001; SUN et al., 2006). Corroborando com estes resultados, Arduim (2006), obteve diversos isolados de raízes de figueira, que proporcionaram 77% de inibição da eclosão de J2 de *M. incognita*, sendo esses valores atribuídos, principalmente, a produção de enzimas; porém, alguns isolados não produziram nenhum tipo de enzima e foram promissores quanto à inibição da eclosão de *M. incognita in vitro*.

Considerando-se o efeito das bactérias sobre a mortalidade dos J2 do nematoide, o isolado XT10 (*Staphylococcus saprophyticus*) foi a mais eficiente apesar de a mesma ter apresentado o pior desempenho na inibição da eclosão (20,6%). Este isolado, embora apresente alta capacidade de colonização radicular (Tabela 3), não produziu nenhum composto (Tabela 1 e 2), indicando a existência de outros mecanismos de ação no biocontrole, diferentes dos presentes neste estudo. Ruanpanun et al. (2011) demonstraram o efeito de diversos compostos obtidos a partir de estreptomicetos sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de *M. incognita*, ressaltando a eficiência de substâncias nematicidas produzidas por biocontroladores como a fervulina. Colaborando com o exposto Lazarovits e Nowak (1997) relatam que algumas bactérias possuem também a capacidade de produzir ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, sendo essas ferramentas de controle.

3.5 Potencial de rizobactérias na promoção do crescimento e no biocontrole de *Meloidogyne javanica* em cana-de-açúcar.

A pesar de nenhum tratamento bacteriano ter reduzido o número de galhas nas raízes das canas microbiolizadas em relação à testemunha, observou-se moderado efeito antagônico das rizobactérias no fator de reprodução, onde apenas os isolados XT 23, XT39, XT 10 e XT 38 suprimiram a reprodução de *M javanica* (32,53 a 41,22%) (Tabela 6). Todavia, pode-se observar que embora o isolado XT 23 tenha proporcionado incremento no número de galhas, em relação à testemunha inoculada, reduziu a multiplicação do nematoide nas raízes da cana

diferindo da testemunha e dos isolados XT 21 e XT 37. Em estudo semelhante Freitas et al. (2005) avaliando o potencial de seis rizobactérias no controle de *M. javanica* em tomateiro, observou que os isolados testados não conseguiram promover o crescimento das plantas. Alguns foram capazes de reduzir o número de galhas causadas por *M. javanica*, porém nenhum teve efeito na redução de galhas causadas por *M. incognita*, caracterizando a especificidade do biocontrole. Coimbra et al. (2005), ao testaram o antagonismo de 92 isolados de rizobactérias a *M. javanica*, observaram que deste total, 34 isolados bacterianos apresentaram redução no número de galhas por planta.

Tabela 6 – Efeito das bactérias no crescimento de plantas de cana-de-açúcar e sobre o nematoide das galhas *M. javanica* quanto aos parâmetros de altura, diâmetro do colmo (DC), massa fresca de parte aérea (MFPA), número de galhas (NG) e fator de reprodução (FR).

Trat.	Altura	DC	MFPA	MFR	NG	FR
Test¹	133,16 a	11,33 a	35,64ab	35,34a	-	-
Test. Salina	126 a	8,05b	20,92 c	24,08b	415,60b	78,81a
XT 23	128 a	11,08 a	32,76 ab	34,05a	631,20 a	46,32b
XT 39	135 a	10,82 a	32,22 ab	39,23a	411,16b	48,44b
XT 37	135,4 a	10,70 a	36,89 a	36,55a	594,40 a	65,21a
XT 10	135,16 a	10,62 a	30,12 b	34,72a	598,50 a	53,17b
XT 38	125,66 a	10,52a	30,40 b	33,93a	404,85b	48,69b
XT 21	133,50 a	10,48a	33,60 ab	38,75a	649,75 a	70,45a
CV%	10,12	11,60	15,44	16,45	21,90	28,11

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%;
¹Testemunha sem nematoide.

Na mesma linha de estudo, Pinho et al. (2008) avaliando 39 isolados de bactérias endofíticas para o controle de *M. incognita* em tomateiro observaram que 15 isolados reduziram concomitantemente o número de galhas, massa de ovos e número de ovos por

grama de raiz. No entanto, apesar de três isolados terem proporcionado redução do número de galhas nas raízes, reduziram o número de massas de ovos e ovos por grama de raiz.

Segundo Junior et al. (2010) avaliando o efeito da microbiolização de sementes de arroz no controle de *M. graminicola* observaram que todos os tratamentos afetaram negativamente o número de galhas por raízes com uma variação de 30 a 70% em relação a testemunha. Porém apenas quatorze tratamentos proporcionaram a redução do fator de reprodução (31 a 62%) do nematoide.

Os resultados apresentados na tabela 6 demonstram o potencial do uso de rizobactérias na promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar. Exceto para a variável altura, a microbiolização das mudas com todos os isolados proporcionaram aumento dos demais parâmetros avaliados (diâmetro do colmo e massa fresca de parte aérea e massa fresca de raiz) em relação à testemunha inoculada e não microbiolizada com as bactérias.

Em estudo semelhante realizado por Ferreira (2015), avaliando a eficiência de diferentes espécies de *Bacillus* e do nematicida carbofurano 350 sc (5L/ha) no controle de *M. javanica* e *M. incognita* em cana, observou que ambos os tratamentos promoveram aumento do número de perfilhos da cana, mesmo não suprimindo a multiplicação dos nematoides. Da mesma forma Junior et al. (2010) realizando trabalhos de microbiolização de sementes de arroz com bactérias, verificaram incremento médio de 18 % de matéria seca de parte aérea em dez tratamentos. Ainda colaborando com o exposto Cardoso (2009) utilizando *Bacillus* no controle de *Meloidogyne* spp. observou que as plantas de cana eram favorecidas pela presença da bactéria, tendo um aumento na altura e massa seca de parte aérea, além de reduzir a reprodução do nematoide.

Segundo Kloepper et al. (1985), o que favorece o controle de nematoides por meio da microbiolização com rizobactérias é o fato de que durante o processo de germinação das sementes ou explantes são liberados exsudados que propiciam vantagem na colonização e sobrevivência bacteriana nas raízes em relação aos fitonematoides, o que prejudica a associação do nematoide com a planta.

3.6 Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar infectadas com o *Pratylenchus zae*.

De acordo com os dados da tabela 7, os isolados de rizobactérias apresentaram diferenças quanto a sua capacidade de promoção de crescimento das plantas, observada através da microbiolização das raízes. O maior perfilhamento foi proporcionado pelo isolado

XT39 e o maior crescimento (altura) de plantas pelos isolados XT33 e XT23, quando comparados com os demais tratamentos bacterianos bem como com as testemunhas com e sem nematoides. O potencial destes isolados está provavelmente correlacionado com o fato de que ambos apresentaram alta capacidade de colonização radicular (Tabela 3), e não ao fato de produziram compostos (Tabela 1).

A promoção de crescimento pode ser o resultado de diversos mecanismos como: controle biológico pela competição por nutrientes com o patógeno, produção de sideróforos e antibióticos, resistência induzida a doenças e promoção de crescimento diretamente pela produção de fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de nitrogênio ou solubilização de fósforo (KLOEPPER, 1993; NEHL et al., 1996; WHIPPS, 2001).

Tabela 7 – Cana-de-açúcar microbiolizada com bactérias e inoculadas com nematoide *P. zaei*. Primeira avaliação aos trinta dias, quanto os parâmetros de número de perfilho, altura, clorofila A (Cloro A), clorofila B (Cloro B) e clorofila total (CloroT).

Tratamento	Nº perfilho	Altura (cm)	Cloro A	Cloro B	Cloro T
XT 39	6,17 a*	144,75 cd	393,45 c	93,29 a	393,45 c
XT 33	3 b	163,08 a	391,83 c	93 a	391,83 c
XT 23	3 b	159,83 ab	390,37 c	90,16 a	390,37 c
P 17	2,5 bc	136,25 d	474,16 a	112,41 a	474,16 a
XT 37	2,17 bcd	135 d	400,41c	99,33 a	400,41 c
XT 26	1,17bcd	149,91 bc	3012,5 c	97,83 a	400,33 c
XT 51	1,66 bcd	140,83 cd	445,63 ab	113,63 a	445,63 ab
XT 56	0,83 d	150,50 bc	411,98 bc	99,3 a	411,98 bc
TSNe	2 bcd	140,2 cd	388,70 c	102,83 a	388,70 c
TCNe	1,16 cd	148,5 c	342,39 d	100,40 a	342,39 d
CV %	43,98	5,45	10,93	19,62	8,12

*Medias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si, pelo teste de Duncan a 5%. Testemunha sem nematoide (TSNe) e testemunha com nematoide (TCNe)

Segundo Loveys e Bird (1973) plantas infectadas por fitonematoides apresentam redução no seu teor de clorofila. Entretanto neste experimento os valores encontrados para a Clorofila B não apresentaram diferenças entre os tratamentos, todavia, tanto com relação a variável Clorofila A quanto a Clorofila total, observa-se que os maiores valores foram proporcionados pelos tratamentos P17 e XT 51 diferindo dos demais tratamentos e das testemunhas com e sem inoculação de *P. zea* (Tabela 7). No entanto, Wille (2013) em seu estudo observou redução significativa no teor de clorofila de figueira microbiolizada com rizobactérias e inoculada com *M. incognita*, demonstrando que as rizobactérias não tiveram efeito sobre o controle desta praga.

Colaborando com o exposto, Martins e Galo (2015) avaliando a caracterização espectral de cana-de-açúcar infectada por nematoides e *Migdolus fryanus* por espectrorradiometria de campo, confirmaram que o estado fisiológico da planta está relacionado com o conteúdo de pigmentos foliar, uma vez que os índices de clorofila A e carotenoides discriminaram as três ocorrências estudadas, sendo eficiente até na separação entre nematoides e *Migdolus fryanus*. Já o índice de clorofila B foi capaz apenas de separar entre plantas sadias e infectadas. Assim demonstrando a sensibilidade do teste clorofila A, para a identificação do estado fisiológico da planta.

4- CONCLUSÃO

Algumas bactérias apresentaram capacidade de solubilizar fosfato e raramente solubilizam potássio.

A maioria dos isolados bacterianos avaliados possuem potencial como agentes de microbiolização de mudas de cana-de-açúcar.

Existem isolados de rizobactérias, provenientes de folhelhos pirobetuminosos que apresentam potencial promissor no biocontrole de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar.

A microbiolização de raízes de mudas de cana-de-açúcar infectadas com *P. zae* reduz os danos causados pelo mesmo.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, 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, v.39, n.5, p.1558-1561, 2009.
- ARDUIM, G. S.. **Controle biológico de *Meloidogyne incognita* raça 2 e promoção de crescimento de figueira por rizobactérias**. 2006. 50 f. Mestrado em Fitossanidade. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2006.
- ALVES, G. C. S., J. M. SANTOS, P. L. M. SOARES, F. G. JESUS, E. J. ALMEIDA, AND R. T. THULER. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaeae*. **Revista Arquivos do Instituto Biológico** p. 557-564, 2011.
- BARBOSA, B. F. F. **Agressividade comparada de *Pratylenchus brachyurus* com *P. zaeae* e eficácia de métodos de controle de nematoides em cana-de-açúcar**. 2012. 120 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.
- BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Anchylostomum-(Nematoden)-Larven in Erdproben. **Ned. Geneesk. Tijdschr.**, v. 57, p. 131- 137, 1917.
- BIRD, A. F.; McCLURE, M. A. The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. **Parasitology**, v.72, p.19-28, 1976.
- BOLOGNA-CAMPBELL, I. **Balanço de nitrogênio e enxofre no sistema solo-ca-de-açúcar no ciclo de cana-planta**. Tese apresentada para obtenção do título de doutor em Agronomia. Área de concentração: Solo e Nutrição de Plantas. Piracicaba 2007.
- CAMPOS, J. T. **Rizobactérias promotoras do crescimento de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Gestão de Recursos Agroambientais. Campinas, SP. 2010.
- CARDOSO, R. B. **Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle de meloidoginose em cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em agronomia. Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente, 2009.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H; CESCAS, M.P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Plant Soil**, 184:311-321, 1996.
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.32, p.117-121. 2000.
- COELHO, L. F.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; AMBROSANO, B. G. M. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1413-1420, 2007.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.3, p.232-238, 2005.

COOLEN, W. A., D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Agriculture Research Center – GHENT**.1972. p.77.

DACKMAN, C.; CHET, I.; NORDBRING-HERTZ, B. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii* infection and enzymatic activity. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.62, p.201-208, 1989.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Manejo de nematoides em cana-de-açúcar. **Jornal Cana** v. 141, p. 64-69, 2005.

DUNNE, C., MOENNE-LOCCOZ, Y., DE BRUIJN, F., OGARA, F., Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. **Microbiology**, v.146, 2069– 2078. 2000.

DUTRA, L. F.; DONINI, L.P.; SILVA, S. D. A.; SILVA, N. D. G.; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M.; Protocolo de micropropagação de cana-de-açúcar. **Circular Técnica 128**, Pelotas , RS Dezembro, 2011.

ENEBAK, S.A.; WEI G. & KLOEPPER, J.W. **Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings**. For. Sci., 44:139-144. 1998.

FERREIRA, R. J. **Espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* in vitro e na cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Agronomia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal, 2015.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; FABRY, C. F. S.; MARRA, B. M.; COUTINHO, M. M.; ROMEIRO, R. S.; FERRAZ, S. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v.29, n2, p. 215-220, 2005.

GADD, G. M. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. **Adv Microb Physiol**, v.41, p.47-92, 1999.

GÍRIO, L. A. S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pre-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v 50, n.1, p.33-43, 2015.

GORBUSHINA, A. A. Life on the rocks. **Environmental Microbiology**, v.9, n.7, p.1613-1631. 2007

HABE, M.H.; UESUGI, C.H. Método “in vitro” para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.657-660, 2000.

- HIRSCH, P.; MEVS, U.; KROPPESTEDT, R.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT E. Cryptoendolithic actinomycetes from Antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. **Syst Appl Microbiol**, v.27, p.166-174. 2004.
- JÚNIOR, I. T. S.; MOURA, A. B.; SCHAFER, J. T.; CORRÊA, B. O.; GOMES, C. B. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.11, p.1259-1267, 2010.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v.31, p.346-52, 2004.
- KHAN, M. Q.; ABBASI, M. W.; ZAKI, M. J.; KHAN, S. A. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates against root-knot nematodes following seed application in okra and mungbean. **Pakistan Journal of Botany**, p. 2903-2910, 2010.
- KLOEPPER, J. W.; SCHER, F. M.; LALIBERTE, M.; ZALESKA, I. Measuring the spermosphere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.926-929, 1985.
- KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., McINROY, J.A.; YOUNG R.W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and rootknot (*Meloidyde incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, v.139, p.74-84, 1992.
- KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: **Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management**. New York: Ed. FBJ meeting, p. 255-274, 1993.
- LAZAROVITZ, G.; NOWAK, J. *Rhizobacterium* for improvement of plant growth and establishment. **Hortscience**, v. 32, p. 188-192, 1997.
- LEE, T. S. G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10, p. 47-55, 1987.
- LOPES, P. S. **Aplicação de rizobactérias em explantes e plântulas de bananeira 'Prata-Anã' no controle de *Meloidogyne javanica* e no desenvolvimento de mudas**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação do Semiárido. Universidade Federal de Montes Claros, Janaúba. 2011.
- LOPEZ-LLORCA, L. V.; ROBERTSON, W. M. Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. **Experimental Mycology**, v.16, p.61-7, 1992.

- LOVEYS, B.R.; BIRD, A.F. The influence of nematodes on photosynthesis in tomato plants. **Physiological Plant Pathology**, v.3, p.525-529, 1973.
- LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 1-49. 1996.
- MARIANO, R.; SILVEIRA, E. B. da. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: UFRP, 2005, 184p.
- MARIANO, R. de. L. R.; SILVEIRA, E. B. da.; ASSIS, S. M. P. de.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2004.
- MARTINS, G. D.; GALO, M. L. B. T. Caracterização espectral da cana-de-açúcar infectada por nematoides e *Migdolus fryanus* por espectrorradiometria de campo. **BCG - Boletim de Ciências Geodésicas**, v.21, n 4°, p 783-796, 2015.
- MISKO, A.L.; GERMIDA, J.J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.
- MERCER, C. F.; GREENWOOD, D. R.; GRANT, J. L. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* chitwood (Nematoda: Tylenchida). **Nematologica**, v.38, p.227-236, 1992.
- MOTA, M. S. **Seleção de bactérias como potenciais biocontroladoras do nematoide anelado do pessegueiro (*Mesocriconema xenoplax*)**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2012.
- NEHL, D.B.; BROWN, J.F. Deleterius rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 1-20, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAUTIYAL, C. S. An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.70, p.265-270, 1999.
- NOVARETTI, W.R.T., CARDERÁN, J.O.; CARPANEZI, A.; RODRIGUES, J.C.S. Comportamento de três variedades de cana-de-açúcar em relação ao nematoide das lesões das raízes *Pratylenchus zae* Graham, 1951. **Nematologia Brasileira**, 12: 110-120. 1988.
- PINHO, R. S. C.;CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M.; SILVA, J. R. C.; OLIVEIRA, M. S.; PIMENTEL G. C. S.; COSTA, L. S. A. S.; Efeito de bactérias endofíticas no controle de meloidogyne incognita e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v33, p 54-60, 2009.
- OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De landbouwhogeschool Te Wageningen**, v.66, n.4, p.1-46, 1966.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.; CHET, I. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. **Plant and Soil**, v.100, p.237-247, 1987.

RYU, E. A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. **Kitasato Arch. Exp. Med.**, v.17, p.58-63, 1940.

RUANPANUN, P.; LAATSCH, H.; TANGCHITSOMKID, N.; LUMYONG, S. Nematicidal activity of ferverulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.27, n.6, p.1373-1380, June, 2011.

SAMAC, D. A, KINDEL, L. L. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. **Plant Soil**, v.235, p.35-44, 2001.

SANTIN, R.C.M. **Potencial do uso dos fungos. *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Phaseolus vulgaris*.** (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF). Porto Alegre, RS, 92p. 2008

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376-1381, 1982.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Role of rhizobacteria in the management of plant-parasitic nematodes: A review: **Bioresource Technology**, v.69, p.167-179, 1999.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. **Critical Review Microbiology**, v.30, p.205-240, 2004.

SOTERRO, A. N.; FREITAS, S.S.; MELO, A. M.T.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista de Brasileira Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.225-234, 2006.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **FLORESTA**, v. 35, n. 2. 2005.

SPIEGEL, Y., E. COHN, S. GALPER, D. LAPID, E. Sharon, and I. Chet. Evaluation of chitinolytic microorganisms for controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. In: **International Nematology Congress**, 2. Veldhoven, Canadá. 1990.

STRAATEN, P. Van. Agroecology: the use of rocks for crops. **Ontario: Enviroquest**, 2007. 440p.

SUGUMARAN, P., JANARTHAM, B. Solubilization of potassium minerals by bacteria and their effect on plant growth. **World Journal of Agricultural Sciences** 3(3), 350-355, 2007.

SUN, M. H.; GAO, L.; SHI, Y. X.; LI, B. J.; LIU, X. Z. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. **J Invertebr Pathol**, v.93, p.22-28, 2006.

SUSLOW, T. V. Role of root colonizing bacteria in plant growth.. In: MOUNT, M. S.; LACY, G. S. (Eds.). **Phytopathogenic Prokaryotes**. New York, NY: Academic Press, 1982. p.187-223.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal, FUNEP. p.372, 1993

TIKHONOV, V. E.; LÓPEZ-LLORCA, L. V.; SALINAS, J.; JANSSON, H-B. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v.35, p.67-78, 2002.

WEI, B. Q.; XUE, Q. Y.; WEI, L. H.; NIU, D. D.; LIU, H. X.; CHEN, L. F.; GUO, J. H. A novel screening strategy to identify biocontrol fungi using protease production or chitinase activity against *Meloidogyne* root-knot nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v.19, n.8, p.859–870, 2009.

WHARTON, D. Nematode egg-shells. **Parasitology**, v.81, p.447-463, 1980.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

WILLE, C. N. **Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e folhelhos pirobetuminosos no controle de *Meloidogyne incognita* em *Ficus carica* cv Roxo de Valinhos.**). Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2013.

ZHANG, Z.; Yuen, G. Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v. 90, n.384-389, 2000.

ZUCKERMAN, B. M.; JASSON, H. B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. **Annual Review Phytopathology**, v.22, p.95-113, 1984

ANEXO A: Esquema ilustrativo da intensidade de colonização radicular, com atribuição de notas de 0 a 3 onde, 0 = nenhuma colonização, 1 = colonização até 1/3 das raízes, 2 = colonização de 1/3 até 2/3 das raízes e 3 = colonização de 2/3 até a totalidade das raízes (HABE; UESUGI, 2000).

