

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. DO RS EM 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. DO RS EM 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

Andressa Calderan Bisognin

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE
Pratylenchus spp. DO RS EM 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)

Frederico Westphalen – RS
2017

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. DO RS EM 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 que mais são afetadas pela presença de fitonematoides, sendo observadas grandes perdas em produtividade a cada ano. Tendo em vista este problema, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar as populações do nematoide das lesões *Pratylenchus* spp provenientes de canaviais do litoral norte (Santo Antônio da Patrulha, Maquiné e Osório) e serra gaúcha (Caxias do Sul), bem como avaliar a reação de agressividade de populações de *Pratylenchus* a dois genótipos de cana-de-açúcar e testar *in vitro* e *in vivo* o antagonismo entre as bactérias e os nematoides *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus zae* para verificar a possibilidade de ser a promoção do crescimento exercida por controle biológico de fitopatógeno.

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* em apenas uma amostra coletada no município de Caxias do Sul estando essa em mistura com *P. zae*, evidenciando sua menor disseminação.

Posteriormente, avaliou-se em casa de vegetação a reação de 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, sendo eles RB935581 e RB966928. No presente trabalho todos os isolados 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 planta, sendo os mais afetados o diâmetro do colmo e massa fresca de raiz.

Para a avaliação das rizobactérias como promotoras de crescimento e agente 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 rochas de folhelhos

pirobetuminosos quanto a sua capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção de crescimento e colonização radicular de cana-de-açúcar. Após, 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 partir dos resultados obtidos, dois isolados foram considerados promissores, quanto à produção de substâncias relacionadas ao biocontrole de fitonematoides, pois foram capazes de produzir quatro compostos (proteases em gelatina, lípases, amônia e fosfatase). A maioria das bactérias avaliadas possuem potencial como agentes de microbiolização de mudas de cana-de-açúcar, apresentando níveis de intensidade de colonização radicular distintos. As rizobactérias XT37 e XT23, isoladas de rochas de folhelhos pirobetuminosos evidenciaram potencial promissor no biocontrole de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, levantamento, nematoides, controle biológico.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND AGGRESSIVENESS OF POPULATIONS OF *Pratylenchus* spp. OF RS IN SUGAR CANE AND MANAGEMENT OF PHYTEMONATE IN CULTURE BY THE USE OF RHIZOBACTERIA

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. The objective of this study was to characterize the nematode populations of the *Pratylenchus* spp lesions from northern cane plantations (Santo Antônio da Patrulha, Maquiné and Osório) and the Rio Grande do Sul (Caxias do Sul), as well as evaluate the Reaction of populations of *Pratylenchus* to two sugarcane genotypes and to test in vitro and in vivo the antagonism between the bacteria and the nematodes *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus zaeae* to verify the possibility of being the promotion of the growth exerted by biological control Of phytopathogen.

In the survey, 16 populations of *Pratylenchus* spp. were obtained, which were characterized by morphological and morphometric characters, being *Pratylenchus zaeae* found in 100% of the evaluated samples and *P. brachyurus* in only one sample collected in the city of Caxias do Sul. In mixture with *P. zaeae*, evidencing its lower dissemination.

Subsequently, the aggressivity reaction of four *Pratylenchus* populations was evaluated in the greenhouse of three *P.zaeae* populations, from Crissiumal, Pelotas and Caxias do Sul, and a population of *P. brachyurus* from Porto Xavier, which were inoculated in two susceptible sugarcane genotypes, being RB935581 and RB966928. In the present study, all isolates were reproduced in both sugarcane cultivars, presenting $RF > 1$, showing distinct levels of aggressiveness, which negatively influenced the development of some plant parameters, being the most affected the diameter of the stem And fresh root dough.

For the evaluation of rhizobacteria as growth promoters and phytonutrient suppression agents, an in vitro selection was first carried out in which 48 isolates of bacteria from the figueira rhizosphere and pyrobetumine shale rocks were tested for their capacity to produce compounds related to biocontrol and / or growth promotion and root colonization of sugarcane. Afterwards, the preselected rhizobacteria were evaluated *in vitro* on the 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* and *P. zea* infected seedlings. From the results obtained, two isolates were considered promising for the production of substances related to phytonutrient biocontrol, since they were able to produce four compounds (proteases in gelatin, lipases, ammonia and phosphatase). Most of the evaluated bacteria have potential as microbiolization agents of sugarcane seedlings, presenting distinct levels of root colonization intensity. The XT37 and XT23 rhizobacteria, isolated from pyrobitum shale rocks, showed a promising potential in the biocontrol of *Meloidogyne javanica* and the growth promotion of sugarcane plants.

Key words: *Saccharum officinarum*, survey, nematodes, biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1 – Mapa demonstrativo dos municípios abrangidos e pontos de coletas de solo e raízes para avaliação da fauna nematológica presente nos canaviais do Rio Grande do Sul. Frederico Westphalen/RS, 2017.....28

Figura 2 – Fotomicrografia de *Pratylenchus zaeae* 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

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.....36

Capítulo 3

Figura 1 – Produção de mudas de cana-de-açúcar a partir da cultura de tecido. Meristema apical (A), Meristema apical com algumas semanas (B) e Mudas prontas para a microbiolização (C)64

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.....74

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Níveis populacionais de fitonematoides 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. 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.....49

Tabela 2 – Parâmetros vegetativos de cultivares de cana-de-açúcar submetidas à inoculação com diferentes populações de *Pratylenchus zeae* e *P.brachyurus*. Frederico Westphalen/RS, 2017.....52

Capítulo 3

Tabela 1 – Identificação de bactérias isoladas de rochas de folhelhos pirobetuminosos (XT e P) e da rizosfera de figueiras (F e FC), e sua capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento de plantas.....70

Tabela 2 – Identificação de bactérias isoladas de rochas de folhelhos pirobetuminosos (XT) rizosfera de figueira (FC) e sua capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento de plantas.....71

Tabela 3 – Intensidade de colonização radicular de bactérias isoladas de rochas folhelhos pirobetuminosos e rizosfera de figueira, microbiolizadas em plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB008347 cultivadas *in vitro* sendo avaliadas aos oito dias após a microbiolização com isolados bacterianos.....73

Tabela 4 – Efeito das bactérias 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).....76

Tabela 5– Percentagem da inibição da eclosão e mortalidade *M. javanica* frente a seis isolados bacterianos, avaliados em 24h e no 12º dia, respectivamente e mantidas sob incubação a 26°C.77

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).....80

Tabela 7 – Cana-de-açúcar microbiolizada com bactérias e inoculadas com nematoide *P. zae*.
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).....82

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
2- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	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	24
1- INTRODUÇÃO	24
2- MATERIAL E MÉTODOS	27
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4- CONCLUSÃO	38
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPITULO II: AGRESSIVIDADE DE <i>Pratylenchus zeae</i> E <i>P. brachyurus</i> À GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	
45	45
1- INTRODUÇÃO	45
2- MATERIAL E MÉTODOS	47
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4- CONCLUSÃO	54
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
CAPITULO III: POTENCIAL DE RIZOBACTÉRIAS NA COLONIZAÇÃO RIZOSFÉRICA, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E MANEJO DE FITONEMATOIDES NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	
59	59
1- INTRODUÇÃO	59
2- MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1- Origem, identificação e manutenção dos isolados bacterianos.	62
2.2- Avaliação dos isolados bacterianos quanto a capacidade de solubilização de compostos.	62
2.2.1- Solubilização de fosfato	63
2.2.2- Solubilização de potássio	63
2.3- Avaliação <i>in vitro</i> da colonização do sistema radicular de mudas de cana-de-açúcar tratadas com bactérias.	63
2.4- Efeito da inoculação de rizobactérias sob os parâmetros vegetativos da cana-de-açúcar	65
2.5- Avaliação dos isolados de rizobactérias <i>in vitro</i> sobre a eclosão e mortalidade de <i>M.</i> <i>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 da cana-de-açúcar cultivada em solo infestado com nematoide-das-lesões.....	67
3- RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
3.1 Identificação das rizobactérias e avaliação da capacidade de solubilização	68
3.2 Avaliação in vitro da colonização do sistema radicular de mudas de cana-de-açúcar tratadas com rizobactérias.....	72
3.3 Efeito da inoculação de rizobactérias sob parâmetros vegetativos da cana-de-açúcar...	75
3.4 Avaliação dos isolados de rizobactérias in vitro sobre a eclosão e mortalidade de <i>Meloidogyne javanica</i>	77
3.5 Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento e no biocontrole de <i>Meloidogyne javanica</i>	79
3.6 Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento de cana-de-açúcar cultivada em solo infestado com <i>Pratylenchus zeae</i>	81
4- CONCLUSÃO	84
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

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, possuindo cerca de vinte milhões de hectares em todo o mundo, sendo 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, representando um acréscimo de 4,9% na produção em relação à safra anterior. O estado de São Paulo, maior produtor do país, é responsável por uma produção de 367,6 milhões de toneladas correspondendo a 55% da produção nacional (CONAB, 2016).

O Rio Grande do Sul possui uma produção de 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 significativa em proporção nacional, apresenta grande importância 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).

Ainda, no estado do RS esta cultura vem ganhando expressão devido às perspectivas de demanda para a produção de combustível renovável, bem como por ser matéria prima de vários produtos alimentícios, evidenciando a necessidade de maiores estudos ligados a pontos críticos para o bom desempenho das lavouras, como manejo fitossanitário, nutricional e melhoramento vegetal.

Referente à questão fitossanitária as maiores perdas relacionadas aos canaviais 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 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 radículas e incapazes de absorver a água e os nutrientes necessários ao adequado desenvolvimento das plantas (DINARDO-MIRANDA, 2005).

A presença desses parasitas nas áreas de cultivo além de reduzirem a produção inviabilizam a implantação de novos canaviais dependendo da população da praga ocorrente no local. 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). De acordo com Sasser e Freckman (1987) as nematoses são responsáveis por 15,3% de perdas mundiais à cana-de-açúcar.

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), podendo também ser realizada através de técnicas mais modernas, como a análise da biologia molecular (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 sem dúvida, o método ideal, mais prático e econômico, não possuindo 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 ocorrem mais de uma espécie de patógeno na área (DINARDO-MIRANDA, 2005).

As limitações do uso da rotação de cultura é 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 microflora do solo, restringem, cada vez mais, a utilização do controle químico. (VILLAS BOAS et al., 2002; VAZ et al., 2011). Como 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, vírus 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 (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).

A ação das rizobactérias na promoção do crescimento das plantas se deve 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 é 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).

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. zaeae*, constatando a presença do nematoide na grande maioria das amostras.

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 na formulação 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 gaúcha do Rio Grande do Sul, no segundo avaliou-se a reação de agressividade 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- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 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 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 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**, Brasília, 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**, 42(2), 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** 16(2): 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 zaeae* 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 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., 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.

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.**, 20:1- 20, 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 zaeae*, 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, Leiden**, 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, pp. 203-212 jul. 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, Montrouge**, 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, Leiden**, 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 ao gênero *Saccharum*, originária do Sudeste da Ásia caracteriza-se por ser de hábito perene, preferindo clima tropical e subtropical. Desta forma, o Brasil por apresentar clima favorável para seu cultivo na maior parte de seu território, tornou-se seu principal produtor (SUBIRÓS-RUIZ, 1995; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Nos últimos 30 anos a cultura canavieira 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.

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 a 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* (Ashby) Dowson), a ferrugem (*Puccinia melanocephala*) e as nematoses as quais causam grandes perdas de 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 ocasionando 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* Grahan, *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 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 que podem chegar a 20 t/ha por corte assim reduzindo drasticamente a vida útil do canavial, isso ainda 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 de a patogenicidade de *P. brachyurus* na cultura da cana-de-açúcar não estar 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 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 eram recebidas no laboratório de análises agrícolas DMLAB, onde 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 à cultura, contrariamente aos de *P. zaeae*, onde os estudos estão mais avançados e sabe-se que as perdas podem ser muito significativas 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 é *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 são *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 coletas na serra gaúcha. Do mesmo modo, em batata, Lima-Medina (2013), identificou a presença dos mesmos tanto nas coletas no RS quanto nas realizadas em Santa Catarina e no Paraná. Deuner et al. (2015) e Santos et al. (2014) também verificaram a presença de ambos os gêneros em soja, caracterizando ainda mais a importância do monitoramento das áreas de plantio, para a realização de manejo adequado.

Os danos causados pelos nematoides podem ser observados nas raízes da cultura e no caso do gênero *Pratylenchus* caracteriza-se por apresentar necrose nas raízes que iniciam por lesões avermelhadas e após tornam-se escurecidas, diminuindo a quantidade de raízes e radicelas. Essa sintomatologia é ocasionada pela presença dos nematoides no interior das raízes, que devido ao hábito alimentar o qual é classificado como um endoparasita migrador, reduz assim 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 que as demais e folhas amareladas devido à deficiência na absorção de água e nutrientes (DINARDO-MIRANDA, 2005; SEVERINO, 2007).

Devido à elevada polifagia das espécies mais ocorrentes nos canaviais, *M. javanica*, *M. incongnita*, *P. zaeae*, *P. brachyurus* e à 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, mas também, inviabilizando a implantação de novos cultivos em áreas altamente infestadas, isso podendo ser atribuído a capacidade de se alimentar de diversos hospedeiros tornando, assim, anti-econômica a exploração de certas culturas (DINARDO-MIRANDA et al., 2003; DINARDO-MIRANDA et al., 2008).

Para que se possam diminuir as perdas ocasionadas pelo ataque desses patógenos é necessário que a diagnose e a identificação da espécie que está atacando o canavial seja precisa, pois essa identificação vai influenciar principalmente nas plantas que serão utilizadas na rotação de cultura para que seja possível diminuir a população do nematoide 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), porém, a identificação também pode ser realizada através de biologia molecular, através da 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). Sendo assim o objetivo desse estudo foi realizar a caracterização das populações de *Pratylenchus* spp. ocorrentes em canaviais nas regiões litorânea e serrana do Rio Grande do Sul, através da análise morfométrica.

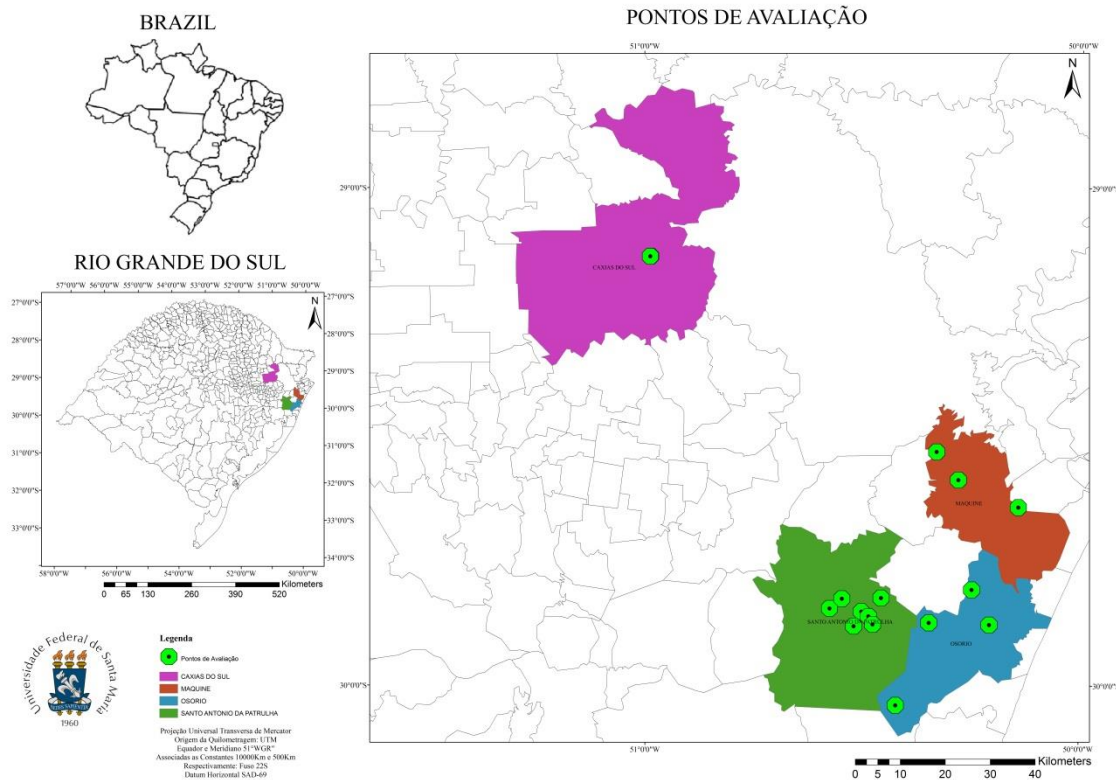
2- MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2015/2016, em 4 municípios do litoral (Santo Antônio da Patrulha, Maquiné e Osório) e serra (Caxias do sul) do Rio Grande do Sul (Figura 1), dezesseis amostras compostas de solo e raízes de cana-de-açúcar foram coletadas e os pontos 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.

Nos locais onde as plantas apresentaram sinais de amarelecimento e/ou raquitismo, em reboleiras, foram realizadas coletas separadamente (TIHOHOD, 1993). 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, e quantificação do nematoide do gênero *Pratylenchus* presente nas amostras (Tabela 1).

Figura 1 – Mapa demonstrativo dos municípios abrangidos e pontos de coletas de solo e raízes para avaliação da ocorrência do nematoide das lesões nos canaviais 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 está 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 Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz (1981). A identificação e quantificação do gênero de interesse das suspensões de solo e raiz foi realizada 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 confirmação e identificação das espécies.

A identificação à nível de espécie de cada população de *Pratylenchus*, foi realizada através do processamento de amostras das raízes de sorgo cultivadas no solo proveniente das coletas através da técnica proposta por Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e

Ferraz (1981), onde foram montadas lâminas temporárias com 20 fêmeas (TIHOHOD, 1993) para observações morfológicas e mensurações microscópicas.

As fotos de micrografias foram observadas 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

Na amostragem realizada nas áreas de produção de cana-de-açúcar do RS, observou-se que o nematoide das lesões esteve presente em todas as áreas (Tabela 1). O gênero *Pratylenchus*, 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) nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas analisaram um total de 1.097 amostras de áreas produtoras de cana-de-açúcar constatando a ocorrência principalmente dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*.

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

N°	Localidade	Raízes/10g	100 cm ³ /solo
		<i>Pratylenchus</i>	<i>Pratylenchus</i>
1	Santo Antônio da Patrulha 1 A	4248	4600
2	Santo Antônio da Patrulha 2 A	6438	3912
3	Santo Antônio da Patrulha 3 A	10042	3866
4	Santo Antônio da Patrulha 4 A	2860	4244
5	Santo Antônio da Patrulha 5 A	6402	5286
6	Santo Antônio da Patrulha 6 A	13560	9000
7	Santo Antônio da Patrulha 7 A	6420	4680
8	Maquiné 10 A	13806	5880
9	Maquiné 12 A	8400	6986
10	Maquiné 13 A	2460	9480
11	Osório 14 A	9992	1920
12	Osório 15 A	10856	6852
13	Osório 18 A	15600	3340
14	Osório 20 A	6040	3720
15	Caxias do Sul 1	4690	2340
16	Caxias do Sul 2	12305	6740

Pratylenchus zae foram encontrados em 100% das amostras avaliadas (Tabela 2), já *P. brachyurus* foi encontrado apenas na amostra coletada no município de Caxias do Sul estando essa em mistura com *P. zae*, evidenciando sua menor disseminação (Tabela 2). Corroborando com estes resultados outro trabalho de levantamento em áreas de produção de cana-de-açúcar realizados no 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, sendo destas 73% identificadas como *P. zae*.

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.

Tabela 2 - Valores morfométricos de espécimes do gênero *Pratylenchus* coletados em canaviais de diferentes municípios do litoral e serra gaúcha. Frederico Westphalen, 2017.

Procedência		L (µm)*	CE (µm)	NARL	DRAV (µm)	V (%)	Espécie	
Santo Antônio da Patrulha	1 A	Média	542,708*	16,041	3	385,144	71,24	<i>P.zeae</i>
		Varição	(472,894 – 613,909)	(15,038 – 16,137)		(332,46 – 455,259)	(69,82 – 73,48)	
	2 A	Média	590,556	16,1334	3	410,195	70,12	<i>P.zeae</i>
		Varição	(519,03 – 650,694)	(15,36 – 16,922)		(366,496 – 472,465)	(69,78 – 72,10)	
	3 A	Média	509,023	16,123	3	355,826	70,714	<i>P.zeae</i>
		Varição	(455,249 – 596,835)	(15,372 – 16,482)		(320,866 – 422,837)	(69,11 – 73,67)	
	4 A	Média	546,08	15,71	3	365,158	71,01	<i>P.zeae</i>
		Varição	(468,451 – 621,873)	(15,049 – 15,871)		(301,212 – 432,579)	(70,03 – 72,12)	
	5 A	Média	549,88	16,25	3	388,176	71,62	<i>P.zeae</i>
		Varição	(434,331 – 644,185)	(15,191 – 17,384)		(321,541 – 456,758)	(70,91 – 72,50)	
	6 A	Média	564,585	16,841	3	394,205	70,65	<i>P.zeae</i>
		Varição	(457,124 – 634,402)	(15,746 – 17,543)		(321,997 – 484,087)	(69,28 – 71,93)	

Continua

Procedência			L (µm)*	CE (µm)	NARL	DRAV (µm)	V (%)	Continua Espécie
Santo Antônio da Patrulha	7 A	Média	564,584	13,273	3	394,204	70,65	<i>P.zeae</i>
		Variação	(457,124-634,712)	(12,758- 15,005)		(321,977-484,087)	(69,67- 74,46)	
Maquiné	10 A	Média	540,212	15,374	3	382,085	71,38	<i>P.zeae</i>
		Variação	(471,264- 586,796)	(15,226 – 15,888)		(318,499 – 422,227)	(70,13 – 73,58)	
	12 A	Média	502,08	16,07	3	354,817	71,38	<i>P.zeae</i>
		Variação	(423,828 – 581,631)	(15,16 – 16,548)		(305,244 – 414,852)	(70,38 – 72,99)	
13 A	Média	511,769	15,224	3	367,694	72,56	<i>P.zeae</i>	
	Variação	(432,456 – 612,348)	(15,054 – 15,540)		(303,898 – 431,079)	(70,71 – 73,96)		
Osório	14 A	Média	527,957	14,943	3	379,019	72,87	<i>P.zeae</i>
		Variação	(441,803 – 632)	(14,425 – 15,690)		(312,647 – 445,212)	(70, 59 – 3,66)	
	15 A	Média	586,296	15,291	3	418,286	70,01	<i>P.zeae</i>
		Variação	(529,081 – 673,119)	(15,150 – 15,627)		(345,544 – 488,988)	(69,53 – 71,10)	

Continua

Procedência		L (µm)*	CE (µm)	NARL	DRAV (µm)	V (%)	Continua Espécie	
Osório	18 A	Média	533,932	16,046	3	380,074	71,79	<i>P.zeae</i>
		Variação	(431,821 – 615,044)	(15,087 – 16,176)		(354,012 – 455,582)	(69,44 – 72,72)	
	20 A	Média	570,159	15,759	3	395,523	70,20	<i>P.zeae</i>
		Variação	(439,915 – 651,087)	(15,038 – 16,994)		(370,490 - 458,441)	(69,11- 78,50)	
Caxias do Sul	1	Média	501,304	15,341	3	364,259	72,04	<i>P.zeae</i>
		Variação	(430,417 – 602,149)	(15,031 – 16,159)		(302,406 – 429,913)	(69,36- 73,15)	
	2	Média	532,179	17,826	2-3	401,447	74,54	<i>P. zeae</i> 48%
		Variação	(465,949 – 680,421)	(15,077 – 18,466)		(320,756 – 596,297)	(69,87- 85,89)	<i>P. brachyurus</i> 52%

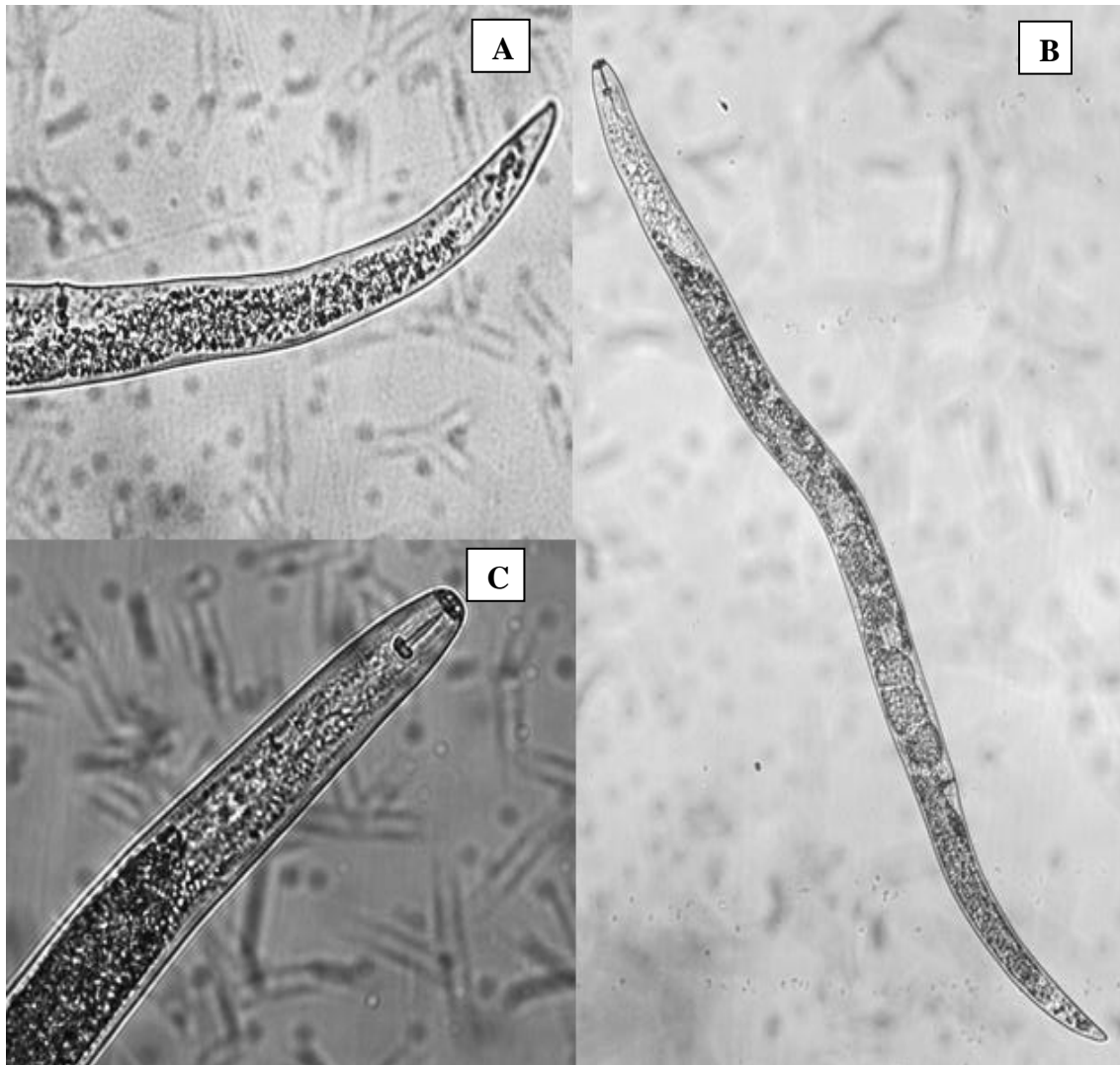
*Comprimento do corpo (L), Comprimento do estilete (CE), Número de anéis da região labial (NARL), Distância da região anterior à vulva (DRAV) e Distância da extremidade anterior da região labial à vulva (V)

Os nematoides do gênero *Pratylenchus* são causadores de necroses do sistema radicular, sendo estas causadas pela movimentação dos mesmos no interior das raízes, reduzindo a área de absorção de água e nutrientes, sendo considerados como os principais causadores do declínio da cana-de-açúcar (DINARDO-MIRANDA, 2010), e consequentemente reduzindo a capacidade de produção de açúcar e etanol (CADET, SPAUL, 2005). A sintomatologia a nível de campo se manifesta na forma de “manchas” ou “reboleiras” de plantas sub desenvolvidas, exibindo clorose e níveis de deficiência nutricional, além de seca de extremidades foliares, contrastando com as plantas saudáveis (GOULART, 2008).

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.

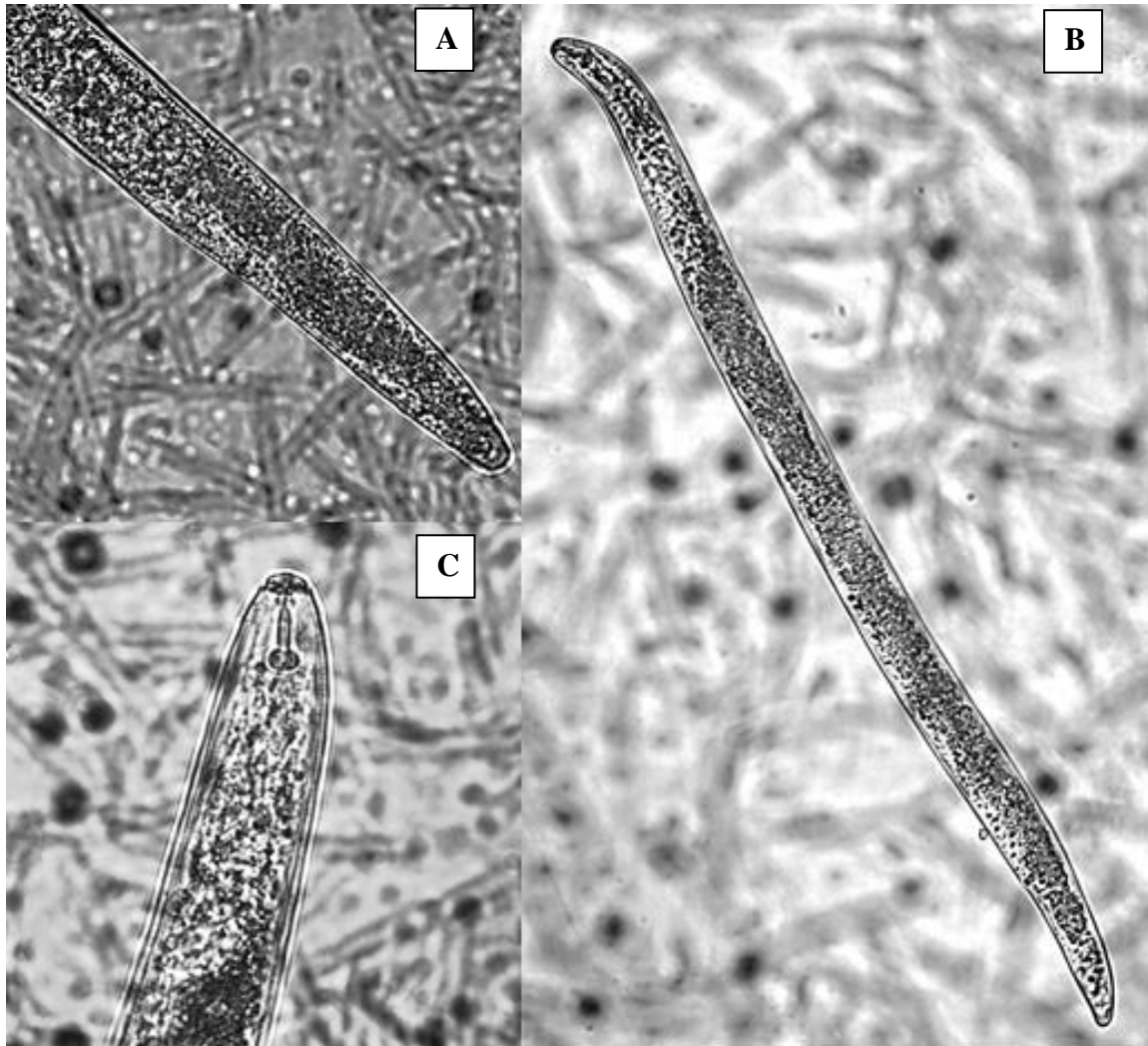
Nas amostras onde se identificou *P. zaeae*, foram observadas apenas fêmeas e juvenis; os espécimes adultos analisados apresentaram três anéis na região labial, achatamento na porção superior dos nódulos basais do estilete (Figura 2C), sendo esse um caráter morfológico relevante para a identificação da espécie. Entretanto o caráter diagnóstico mais marcante para a espécie é a posição mais anterior da vulva (Figura 2A) quando comparada a outra espécie desse gênero incluída nesse estudo (LOOF, 1991). A conformação da cauda dos espécimes das populações de *P. zaeae* observados no presente estudo apresentaram forma 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 zaeae* 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.



Entre as especificidades da população *P. brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, também caracterizam-se por apresentarem a ocorrência apenas de 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 são massivos e arredondados, a posição da vulva se encontrando mais posterior (Figura 3 A) em relação à outras espécies de *Pratylenchus* envolvida neste estudo, além de apresentar cauda hemisférica com termino liso. Para a identificação desta espécie também foram utilizados os parâmetros morfométricos preconizados por Loof (1991) e por Gonzaga (2006).

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 à 15600 espécimes/10g de raízes e de 1920 à 9480 espécimes/ 100cm³ de solo. Este valor está bem acima do nível de ano econômico, conforme o critério de Barros et al. (2005) que considera como alto valores acima de 1500 *Pratylenchus*/50 g de raízes.

Entre as espécies do nematoide das lesões que afetam a cultura da cana-de-açúcar destaca-se o *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. zae* 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) ressaltam a grande agressividade de *P. zae* a 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.

Este estudo de dispersão geográfica identificando a diversidade e nível populacional do nematoide das lesões relacionado à cultura da cana-de-açúcar faz-se necessário para a mensuração da ocorrência, bem como para elaboração de estratégias de controle em níveis regionais, pois sabe-se o grande potencial danoso 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

Pratylenchus zae esteve presente em todas as áreas avaliadas, em altos níveis populacionais, parasitando cana-de-açúcar do Rio Grande do Sul.

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-BARBECH, 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**, New York, 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. zeae*. **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 zeae*. **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 zeae***. 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 zeae*. **Revista Caatinga**, v. 30, n.2, p. 530-535, abr.-jun, 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.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 553, 1981.

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**, Brasília, 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**, Riverside, v. 29, p. 23-29, 1997.

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. Nematóides: 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 zaeae*. **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**, Montrouge, 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.

GOULART, A. M. C. **Aspectos Gerais sobre nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 30 p

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

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**, Riverside, 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**. New York: Marcel Dekker, Inc., 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 zaeae* 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 Agrônômica**. p. 16-24, 1983

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 (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**, Tokyo, 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**, Riverside, 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 nematóide das galhas em videira nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e estudo da resistência de portanexertos 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**, Leiden, 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. **EPP0 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**, Montrouge, 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**, Leiden, 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**, Riverside, 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**, Lancaster, v. 85, p. 1231-1237, 1995.

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

1- INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar esta difundida para todas as regiões brasileiras e seu cultivo possui grande importância econômica para o agronegócio brasileiro, consolidando-se fortemente neste seguimento, ocupando posição de destaque devido principalmente à geração de combustível renovável, bem como pela sua importância na fabricação de seus 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 produtividade 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, fazem com que seja necessário o aumento da produtividade, sendo assim necessários maiores estudos em melhoramento genético, adaptabilidade para diferentes regiões produtivas, 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 sua densidade populacional 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 20t/ha por corte, ocasionando diminuição drástica da produtividade e longevidade do canavial (DINARDO-MIRANDA, 2005). Sendo as perdas 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 pela ocorrência de nematoides na cana ocorrem no sistema radicular, local onde estes parasitas extraem nutrientes para o seu desenvolvimento, causando galhas e lesões escurecidas, as quais prejudicam o metabolismo da planta. Além dos danos

causados na retirada de nutrientes da planta, esses parasitas injetam toxinas, que no caso de *Meloidogyne* sp. resulta na formação de galhas. Quando as raízes são atacadas por *Pratylenchus* sp., as mesmas apresentam danos que inicialmente são avermelhados, e, posteriormente ficam escurecidos e necrosados. Como consequência do ataque dos nematoides ocorre à redução do número de raízes, reduzindo assim a absorção de água e nutrientes, e tendo como sintomas reflexos na parte aérea, 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. zaeae* 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. zaeae* a espécie mais comumente encontrada (CADET, SPAULL, 2005; DUNCAN, MOENS, 2006).

P. zaeae é uma das espécies de nematoides de maior importância para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil, 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). Entretanto, apesar de *P. brachyurus* também ser comumente encontrado em canaviais brasileiros, 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 dessas espécies 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 incorporação de matéria orgânica (DINARDO-MIRANDA et al., 1995; BARROS et al., 2000). Contudo, o plantio de variedades resistentes ou tolerantes é a solução ideal para o problema dos 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 (LORDELLO, 1981). Entretanto, poucos são genótipos com alguma resistência disponíveis no mercado nacional e 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 zaeae* e *P. brachyurus*. Dentre os trabalhos encontrados na literatura que relatam reações de resistência de cana-de-açúcar ao nematoide das lesões, destacam-se os realizados por DINARDO-MIRANDA (1994); DINARDO-MIRANDA et al. (1996); BARBOSA (2008); BARBOSA (2012) e de BELLÉ (2017).

Considerando-se o potencial patogênico de *Pratylenchus zaeae* e *P. brachyurus* em plantas de cana-de-açúcar e a carência de trabalhos referentes à reação de cultivares aos nematoides das lesões, fica evidente a necessidade de mais estudos nessa área. Deste modo o presente trabalho teve por objetivo avaliar a agressividade de populações do nematoide das lesões, *P. zaeae* e *P. brachyurus*, à genótipos 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 níveis diferentes de suscetibilidade a *Pratylenchus zaeae* (BELLÉ et al., 2017), sendo altamente suscetível (FR=26,31) e medianamente suscetível (FR=8,54), respectivamente. As mudas de cana foram obtidas a partir de mini rebolo, provenientes da Embrapa Clima Temperado.

Os inócuos de *Pratylenchus brachyurus* e *P. zaeae* 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 4 populações de *Pratylenchus*, sendo 3 populações de *P.zaeae*, 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 estéreis na proporção 2:1, sendo,

posteriormente, realizada a inoculação dos nematoides através de uma suspensão contendo 1000 espécimes obtidos conforme método de Hussey e Barker (1973) modificado por Bonetti e Ferraz (1981) sendo inoculados em dois orifícios feitos próximos ao colo da planta.

O experimento foi composto por seis repetições por tratamento, utilizando-se como testemunha susceptível plantas de sorgo BRS 506 (*Sorghum vulgare* L.), e plantas de cana dos mesmos genótipos sem inoculação, para posterior comparação. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por um período de oito meses.

A viabilidade dos inóculos foi verificada nas mudas de sorgo BRS 506 (*Sorghum vulgare* L.), inoculadas com as mesmas populações e mesmo nível de inóculo utilizado nas 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).

Decorridos 240 dias da inoculação das mudas de cana, as plantas foram retiradas de cada vaso, separando-se raiz e parte aérea para avaliação. O sistema radicular de cada repetição foi lavado, pesado e processado para extração dos nematoides (população final) conforme metodologia de Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981) para quantificação e determinação do fator de reprodução do nematoide (FR=população final/população inicial), conforme Oostenbrink (1966). A agressividade foi avaliada pela interferência das populações do nematoide no desenvolvimento das plantas e sua reprodução nos diferentes genótipos.

As variáveis analisadas para parte aérea foram: altura de planta, diâmetro do colmo, número de perfilhos e massa fresca.

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

A diversidade entre as populações de *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus* quanto a sua patogenicidade, pode ser observada nos resultados da Tabela 1, onde todos os isolados se reproduziram em ambas cultivares de cana-de-açúcar, apresentando $FR > 1$, demonstrando níveis de agressividade. Estas variações referentes ao índice de fator reprodutivo das

populações pode estar associado a condições climáticas, umidade do solo, bem como a virulência intrínseca das populações utilizadas para a elaboração 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				CV%
	PbPX**	PzCr	PzPl	PzCS	
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 (PzPl) e *P. zaeae* origem Caxias do Sul (PzCS).

De acordo com os resultados da Tabela 1, para o genótipo RB935581, a população PzPl (FR=12,58) foi a que demonstrou maior fator de reprodução não diferindo estatisticamente da população PzCr (FR=10,60), demonstrando maior agressividade em relação as demais. Em relação à reprodução do nematoide no genótipo RB966928, os maiores valores de FR foram observados pelas mesmas populações de *P. zaeae* (PzPl e PzCr) que infectaram o genótipo RB93581, mais a população de *P. brachyurus* (PbPX). E a população PzCS, foi a que menos se multiplicou em ambos os genótipos de cana. 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.

Bellé et al. (2017) avaliando a reação de genótipos de cana a um isolado de *P. zaeae*, observaram que para os 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, Moura e Oliveira (2009) mencionam que encontraram fator de reprodução de 47,6 na variedade de cana SP70-1011 infestada com o nematoide *P. zaeae* em condições experimentais favoráveis ao desenvolvimento do nematoide.

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* foi similar, sendo valores de 8,96 para o genótipo RB935581 e 8,33 para o genótipo RB 966928 (Tabela 1), demonstrando a suscetibilidade destes genótipos e esta espécie de *Pratylenchus*. Outros trabalhos também relatam a capacidade de multiplicação de *P. brachyurus* em cana-de-açúcar, demonstrada através de fator de reprodução maior que um (Barbosa, 2008 e Dinardo-Miranda, 1994).

A espécie *P. brachyurus* é mencionada também como causadora de danos em outras culturas pertencentes a família das poaceas, 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.

Todas as populações do nematoide das lesões multiplicaram-se melhor no genótipo RB935581, embora diferença significativa entre as cultivares somente tenha sido detectada para a população de *P. zaeae* (PzPl) (Tabela 1). Estes dados confirmam a classificação destes dois genótipos em altamente suscetível (RB935581) e moderadamente suscetível (RB966928) ao nematoide das lesões, conforme estudo de reação de genótipos de cana à *P. zaeae*, realizado por Bellé (2017). Da mesma forma Dinardo-Miranda (1996) avaliando seis cultivares de cana observou que a maioria dos materiais comportou-se como hospedeiro favorável a *P. zaeae*, confirmando a suscetibilidade desta cultura para o referido nematoide.

Com relação à interferência do parasitismo das diferentes populações de *P. zaeae* e *P. brachyurus* nos parâmetros vegetativos de ambos os genótipos de cana (Tabela 2) pode-se observar diferenças entre as populações e a testemunha, sem inoculação, para a maioria dos parâmetros avaliados.

As inoculações das diferentes populações de *Pratylenchus* interferiram diferentemente sobre o número de perfilhos de ambos os genótipo de cana-de-açúcar, e contrariando ao parasitismo do nematoide, para o genótipo RB935581, as plantas apresentaram maior

perfilhamento em relação à testemunha (sem inoculação). A população PzCS, que proporcionou maior perfilhamento nas plantas de RB935581 (11,24) foi a mesma que apresentou o menor fator de reprodução para esta cultivar (Tabela 1), caracterizando sua menor agressividade. Barbosa (2012) menciona que o maior desenvolvimento de cana-de-açúcar infestada com nematoides, em baixa população, pode ser devido a uma resposta fisiológica, onde a planta tende a se recuperar do ataque emitindo novas raízes laterais que acabam estimulando o desenvolvimento inicial das plantas.

Todas as populações de *Pratylenchus* comprometeram negativamente o desenvolvimento de ambos os genótipos de cana-de-açúcar, os quais apresentaram menor diâmetro do colmo e massa fresca de raiz em relação à testemunha não inoculada (Tabela 2), comprovando a patogenicidade das populações. A população PzPl foi a que expressou maior agressividade para o genótipo RB935581 diminuindo significativamente o diâmetro do colmo quando comparada com as demais populações e também reduziu o peso radicular de ambos os genótipos, sendo este efeito negativo correlacionado ao fato de ter sido a maior a população de nematoide observada. A interferência negativa sobre o desenvolvimento das plantas devido a 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).

Contrário ao fato de os fitonematoides comprometerem o sistema radicular das plantas, as inoculações das diferentes populações de *Pratylenchus* nos genótipos de cana-de-açúcar proporcionaram altura de planta maior ou igual a testemunha (sem inoculação), não demonstrando efeito de patogenicidade através dessa variável, mesmo sabendo-se que estes genótipos são classificados como suscetíveis e as populações de *Pratylenchus* tenham apresentam $FR > 1$. O comportamento variável de diferentes variedades de cana-de-açúcar, onde nem sempre os maiores números de nematoides refletem em redução nos parâmetros vegetativos da planta foi evidenciado no trabalho realizado por Barros et al. (2005), no qual observou que a variedade SP79- 1011 foi a que apresentou maior número de nematoides

(*Meloidogyne* + *Pratylenchus*) nas amostras, no entanto, não teve seu rendimento comprometido quando comparada com as variedades RB855156 e RB966928

Tabela 2 – Parâmetros vegetativos de cultivares de cana-de-açúcar submetidas à inoculação com diferentes populações de *Pratylenchus zae* e *P.brachyurus*. Frederico Westphalen/RS, 2017.

Número de Perfilhos						
Genótipo	PbPX**	PzCr	PzPl	PzCS	Test	CV%
RB935581	9,00 AB	8,50 AB	9,60 AB	11,24 A	7,0 B	27,33
RB966928	2,60 A	1,80 A	2,40 A	2,5 A	3,5 A	63,51

Diâmetro do Colmo (mm)						
	PbPX	PzCr	PzPl	PzCS	Test	CV%
RB935581	19,72 B	20,19 B	18,12 C	20,30 B	21,61 A	4,018
RB966928	19,71 B	19,36 B	19,42 B	21,44 B	24,59 A	8,47

Altura (m)						
	PbPX	PzCr	PzPl	PzCS	Test	CV%
RB935581	2,38 A	2,29 A	2,36 A	2,19 A	2,15 A	14,14
RB966928	2,68 A	2,91 A	2,99 A	2,57 AB	2,41 B	11,84

Massa fresca de parte aérea (gr)						
	PbPX	PzCr	PzPl	PzCS	Test	CV %
RB935581	652,9 C	766,6 A	692,6 BC	826,7 A	797,2AB	9,7
RB966928	670,3 B	672,5B	713,1AB	778,1 A	709,8AB	7,4

Peso de raiz (gr)						
	PbPX	PzCr	PzPl	PzCS	Test	CV%
RB935581	633,2 B	581,74 B	575,64 B	636,23 B	1125,33 A	10,99
RB966928	328,5 B	317,68 B	348,98 B	384,35 B	630 A	28,59

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha 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 (PzPl) e *P. zae* origem Caxias do Sul (PzCS).

Ao avaliarmos a agressividade de cada população aos genótipos de cana, através da variável massa fresca de parte aérea observa-se a ação patogênica dos fitonematoides para ambos os genótipos (Tabela 2). Para o genótipo RB935581 as populações PbPX e PzPl foram as que reduziram significativamente o peso da parte aérea em relação a testemunha (sem inoculação) em 18% e 13,12%. Já para o genótipo RB966928, a interferência negativa na parte área foi observada quando foram inoculadas as populações de PbPX e PzCr, demonstrando variabilidade na agressividade entre as populações, mesmo não diferindo da testemunha. Corroborando com este resultados Barbosa et al. (2013) relataram que *Pratylenchus brachyurus* foi mais agressivo que *P. zae* à variedade de cana-de-açúcar CTC

2, proporcionando perdas ao volume estimado e à massa fresca da parte aérea, considerando-se todos os níveis inoculados.

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 a 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) avaliando nove variedades quanto ao efeito de *P. brachyurus* quanto as variáveis, massa fresca de parte aérea, diâmetro do colmo e altura até a primeira folha constatou efeito negativo para a maioria das cultivares, no entanto apenas uma foi considerada suscetível chegando a esse resultado avaliando-se também o fator de reprodução que foi 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 essa praga aos canaviais infestados.

Mesmo que para altura da planta e perfilhamento do genótipo RB935581 não se evidencie diferenças quando se compara a presença ou ausência dos nematoides das lesões, para a grande maioria dos parâmetros vegetativos houve interferência negativa. 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, apresentando $FR > 1$, demonstrando níveis de agressividade distintos.

Ambos os genótipos de cana apresentaram suscetibilidade, sendo RB935581 mais suscetível.

As populações de nematoides influenciaram negativamente o desenvolvimento das plantas nos parâmetros vegetativos, porém com baixa intensidade. O maior efeito negativo foi observado para as variáveis 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, abr.-jun, 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.

BONETI, J.I.S.; S. FERRAZ. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 553, 1981.

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.

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.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028, 1973.

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 zae* 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 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.; 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 zae* 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 zae* (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 zae* 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, isso é devido à soma de vários fatores que favorecem a multiplicação destes fitonematoides, entre estes estão, a ausência de variedades resistentes, o ciclo de cultivo perene, alta polifagia, ampla distribuição geográfica, e a baixa eficiência dos nematicidas, acarretando na diminuição da vida útil do canavial (DINARDO-MIRANDA, 2005; BARBOSA, 2012).

A grande preocupação com relação ao ataque dessas pragas é o dano causado ao sistema radicular, que fica debilitado, não conseguindo suprir a demanda por nutrientes e água para a planta. Os sintomas nas raízes quando infectadas por *Meloidogyne* são 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 devido à 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 controle, sendo assim a utilização de bactérias uma promissora opção, considerando que as mesmas colonizam o sistema radicular promovendo benefícios a planta, 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).

O controle biológico promovido por rizobactérias pode ocorrer de várias formas, através do parasitismo, da produção de metabólitos que interferem na reprodução, postura 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.

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, rizadorremediadoras, quando degradam poluentes orgânicos (SOMERS, VANDERLEYDEN, SRINIVASAN, 2004).

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. Todavia, sua forma de multiplicação ainda é dificultosa, pois a mesma necessita de um hospedeiro vivo para multiplicar-se, não sendo possível realizar este processo em meio de cultura, dificultando, desta forma, a sua produção em larga escala.

Devido a isso, novas 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.

Em estudo avaliando o efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonizar raízes de tomateiro Pinho et al. (2008) 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, massa de ovos e 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 a promoção do crescimento de plantas de tomate Araujo e Marchesi (2009) encontraram como resultados que *B. subtilis* promoveu o aumento da biomassa de parte aérea e reduziu a reprodução dos nematoides formadores de galhas. 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 observaram que o maior controle e promoção do crescimento foi alcançada pelas combinações de rizobactérias.

Considerando a grande diversidade de vida no solo e suas estreitas associações entre os diferentes grupos de micro-organismos, podendo ter interações sinérgicas e depredação ou parasitismo, não se deve ignorar o enorme potencial de biocontrole das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas sobre fitonematóides 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 risosfera de figueira e de rochas de folhelhos pirobetuminosos quanto a solubilização de compostos e colonização radicular de mudas 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 e manutenção dos isolados bacterianos.

Os 48 isolados bacterianos avaliados foram provenientes da coleção de microrganismos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, sendo estes isolados da rizosfera de figueira e de rochas de folhelhos pirobetuminosos e 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, 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 rochas de folhelhos pirobetuminosos. Destes, vinte e seis isolados tinham sido caracterizados, em trabalhos anteriores, 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) (WILLE, 2013).

Neste experimento inicialmente foi realizada a identificação das demais rizobactérias a nível de espécie e a avaliação da capacidade de formação de novos compostos *in vitro*, para todos os isolados. A identificação dos isolados de rizobactérias a nível de espécie, ainda não identificados, foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado realizando-se testes de caracterização da parede celular através do teste de Gram (WILLE, 2013) e KOH 3% (RYU, 1940). 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 e posterior sequenciamento (WILLE, 2013).

2.2- Avaliação dos isolados bacterianos quanto a capacidade de solubilização de compostos.

A capacidade das bactérias em promover o crescimento das plantas pode estar ligada a capacidade que as mesmas possuem de solubilizar alguns compostos presentes no ambiente, como potássio e fosfato. 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} , então repicados para tubos de ensaio e mantidas na coleção.

2.2.1- Solubilização de fosfato

Para a avaliação da capacidade de solubilização de fosfato as bactérias foram repicadas 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, as mesmas bactérias, citadas anteriormente, foram repicadas para o meio de Aleksandrov e incubadas a 37 °C por uma semana (SUGUMARAN, JANARTHAM, 2007).

Para a avaliação foi realizada a observação da presença do halo claro em torno da colônia, o que caracteriza a solubilização de potássio.

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

Para a elaboração deste ensaio foram utilizadas 48 bactérias pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado que foram obtidas a partir do isolamento de rochas de folhelhos pirobetuminosos e da rizosfera de figueira (*Ficus carica*).

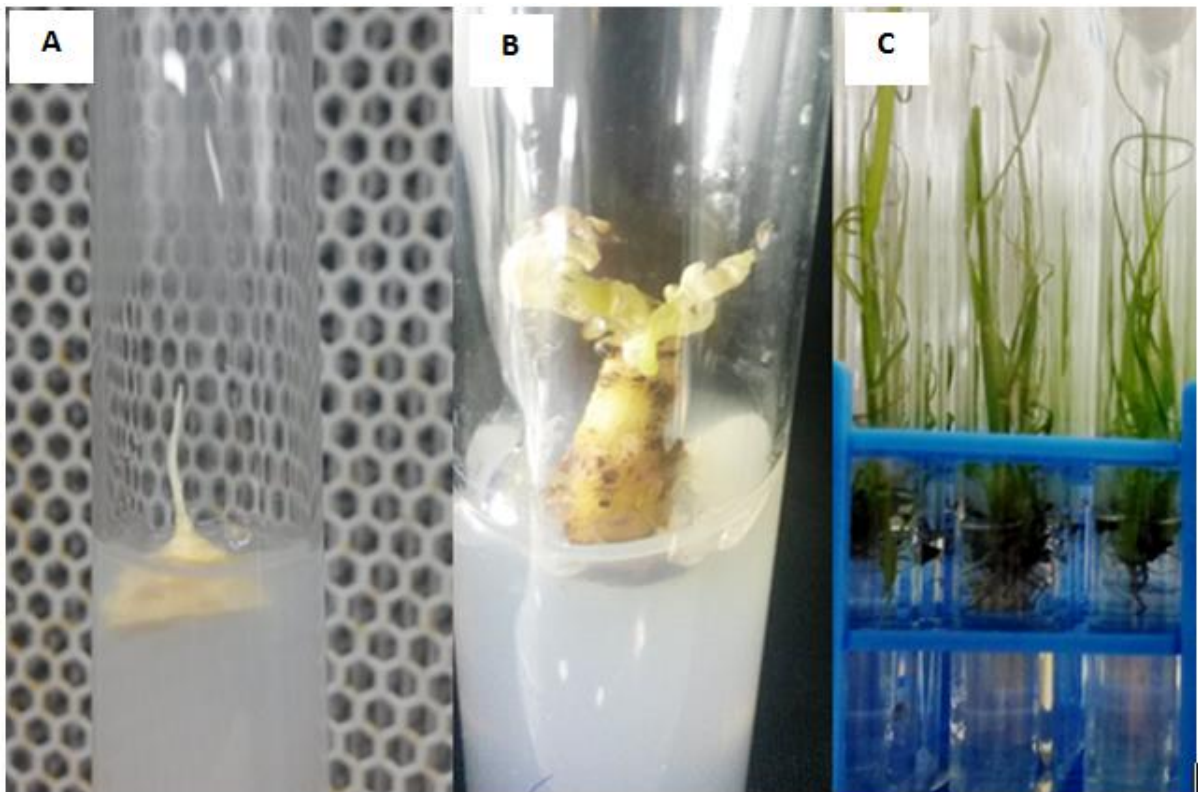
Primeiramente as bactérias foram repicadas para placas de Petri contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970) e incubadas a 28°C por 48 horas. Após esse período, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, foi realizada uma suspensão, contendo solução salina (NaCl 0,85%), de cada um dos isolados bacterianos,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

As mudas de cana-de-açúcar utilizadas para a microbiolização foram do genótipo RB008347, 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%, 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 estavam imersos em ácido cítrico a 1,5% para evitar a oxidação, posteriormente transferidos para tubos

de ensaio (Figura 1) que continham sais do meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) adicionado de 0,2 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de cinetina (LEE, 1987), e mantidos por 5 dias no escuro a 25 ± 2°C com 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, e posteriormente realizada a primeira repicagem. Entretanto, objetivando-se uma alta taxa de multiplicação das canas, realizaram-se quatro repicagens, uma a cada 30 dias (DUTRA et al., 2011).

Figura 1 – Produção de mudas de cana-de-açúcar a partir da cultura de tecido. Meristema apical (A), Meristema apical com algumas semanas (B) e Mudas prontas para a microbiolização (C).



Após trinta dias da última repicagem, as mudas utilizadas para a microbiolização tiveram suas raízes lavadas três vezes em água destilada esterilizada para retirar resquícios de meio de cultivo ainda presentes nas raízes. A seguir, as raízes foram imersas na suspensão bacteriana, por 30 minutos, e, passado esse período, 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 bactéria, e a testemunha imersa somente em água salina.

A avaliação da colonização foi realizada aos oito dias após a microbiolização, onde observou-se a 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 ao teste de variância Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, onde foram selecionadas as bactérias com maior potencial de colonização para realização dos ensaios de avaliação do potencial dessas rizobactérias como promotoras do crescimento de mudas microbiolizadas e no biocontrole de fitonematoides da cana-de-açúcar.

2.4- Efeito da inoculação de rizobactérias sob os parâmetros vegetativos da cana-de-açúcar

Para a realização deste ensaio utilizou-se as bactérias XT56, P17, XT51, XT33, XT23, XT39, XT26, XT37, já pré-selecionadas no ensaio de colonização radicular, as quais foram repicadas em placas de Petri contendo meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970) e incubadas por 48h em BOD a temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12h. Após esse período realizou-se a preparação da suspensão com solução salina (NaCL 0,85%) de cada um dos isolados, sendo calibradas em espectrofotômetro, com absorvância de 540 nanômetros, padronizadas em $A = 5$ (WILLE, 2013).

Após a calibragem foi realizada inoculação das mudas, adicionando-se 30 ml de suspensão bacteriana em cada vaso contendo uma planta de cana-de-açúcar cultivar RB008347 obtida através de cultura de tecido, sendo realizadas 5 repetições por tratamento. Após 15 dias da realização da inoculação foram avaliados os parâmetros de altura, peso de parte aérea, peso de raiz, clorofila A e B e clorofila total.

2.5- Avaliação dos isolados de rizobactérias in vitro sobre a eclosão e mortalidade 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 solução foi utilizada para a retirada de ovos, sendo então conduzido o ensaio da eclosão e o restante foi acomodado em funil de Bauermamm para a eclosão dos juvenis que foram utilizados após 24h para elaboração do ensaio da mortalidade.

Para a avaliação da eclosão utilizou-se suspensão de 30 μL com 30 ovos sendo essa colocada nas cavidades de placas de microtitulação contendo 20 μL de água destilada esterilizada, nos quais foi depositado 50 μL da suspensão das mesmas bactérias utilizadas no ensaio anterior, individualmente, preparadas conforme descrito anteriormente. Como testemunha, foi utilizada suspensão de 30 ovos de *M. javanica* imersos em 20 μL de água destilada esterilizada e 50 μL de solução salina (NaCl 0,85%) em cada orifício da placa. Cada orifício foi considerado uma repetição, totalizando quatro repetições de 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, verificando-se o número de J2 eclodidos.

Para a avaliação da mortalidade, juvenis de segundo estágio (J2) foram depositados em densidade média de 30 nematoides nas cavidades da placa de microtitulação de 96 poços (tipo ELISA) contendo 20 μL de água destilada esterilizada. Após, foi preparada a suspensão bacteriana dos seguintes isolados XT10, XT 21, XT 23, XT 37, XT 38 e XT39, onde, cada colônia dos isolados bacterianos foram misturados com solução salina (NaCl 0,85%) e calibrados em espectrofotômetro, com absorvância de 540 nanômetros, sendo padronizadas em $A=5$ (WILLE, 2013). Esta suspensão foi então, adicionada, individualmente, no volume de 50 μL , em cada cavidade contendo a suspensão de nematoides. Como testemunha, foi utilizada 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%) em cada cavidade da placa. Ensaio foi conduzido com quatro repetições.

Em seguida, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas no escuro, a 26 C, durante 24 horas. Após, 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, pela observação em microscópio estereoscópico, considerando-se como mortos os J2 que permaneceram com o corpo completamente distendido durante 3 minutos após a adição NaOH.

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 biocontrole com bactérias sobre o nematoide-das-galhas, *Meloidogyne javanica*, inoculado em plantas de cana-de-açúcar. Utilizou-se plantas individuais da variedade de cana-de-açúcar RB008347, as quais foram microbiolizadas com 30 ml de solução bacteriana, sendo as rizobactérias utilizadas XT10, XT38, XT39, XT37, XT21, XT23, estando as plantas acondicionadas em vasos com solo autoclavado. Transcorridos 10 dias da microbiolização as mudas foram inoculados com 5000 ovos + J₂ de *M. javanica* por planta, utilizando-se seis repetições por tratamento.

Como testemunhas, utilizou-se plantas de cana-de-açúcar da mesma variedade, imersas apenas em solução salina, e inoculadas com o mesmo nível de inóculo 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, altura da planta, número de galhas e fator de reprodução (FR = população final/população inicial) segundo Oostembrink (1966).

As médias obtidas nas diferentes variáveis foram comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade do erro.

2.7- Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solo infestado com nematoide-das-lesões.

Para a condução deste ensaio, a propagação das mudas, que são do genótipo RB008347, foi realizada através de cultura de tecido no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado/RS. O inóculo de *Pratylenchus zae* 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 de Hussey e Barker (1973) modificado por Bonetti e Ferraz (1981).

As plantas de cana-de-açúcar foram microbiolizadas com as bactérias XT56, P17, XT51, XT33, XT23, XT39, XT26, XT37, transplantadas para vasos contendo substrato, e, após 10 dias da microbiolização realizou-se a inoculação de 1000 espécimes de *Pratylenchus zae*, com seis repetições. As variáveis avaliadas foram diâmetro do colmo, altura de planta e teor clorofila, sendo as avaliações de biocontrole realizadas a posteriore.

3- RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Identificação das rizobactérias e avaliação da capacidade de solubilização

As rizobactérias são bactérias de solo que colonizam as raízes, podem ser epifíticas ou endofíticas, não patogênicas, que atuam diretamente promovendo o crescimento ou, indiretamente, como agentes de controle biológico de doenças de plantas.

De acordo com os resultados das Tabelas 1 e 2, 64,58% dos isolados bacterianos foram identificados, caracterizando uma grande diversidade de espécies de rizobactérias isoladas de rochas 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 estando presentes em todos os solos agrícolas, e adaptável para o crescimento na rizosfera (CAMPOS, 2010), estando a mesmas frequentemente associada a promoção do crescimento e controle biológico (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

Testes *in vitro* são importantes para seleção de organismos mais promissores para o controle biológico de nematoides (BARRA et al., 2008), pois a avaliação de um número amplo de isolados diretamente através de testes *in vivo* é inviável, devido a sua laboriosidade. Nessa etapa várias características desejáveis como produção de enzimas relacionadas à degradação de ovos como quitinases (STIRLING, MANKAU, 1979), proteases (DACKMAN et al., 1989) e lípases são investigadas.

Dos 26 isolados selecionados e submetidos à avaliação da capacidade quanto à produção de compostos, dois isolados foram considerados promissores, quanto à produção de substâncias relacionadas ao biocontrole de fitonematoides, pois foram capazes de produzir quatro compostos (proteases em gelatina, lípases, amônia e fosfatase) dos seis compostos avaliados. Nenhum dos isolados foi capaz de produzir todos os seis compostos testados, degradar a quitina e solubilizar potássio. Apenas 29,17% dos isolados de rochas não produziram nenhum tipo de composto relacionado ao biocontrole de fitonematoides (Tabela1).

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 tenha produzido quitinase, a produção de proteases foi frequente, sendo 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, também 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, foi verificada 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 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 e/ou promoção do crescimento de plantas.

Isolados bacterianos	Identificação	Q	PL	PG	L	A	P**	K**	N° C.P.
XT02	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	+	-	+	+	-	-	3
P09	<i>Pseudomonas denitrificans</i> *	-	-	-	-	+	-	-	1
XT10	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	0
P10	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	+	+	-	+	-	3
XT11	<i>Exiguobacterium acetylium</i>	-	+	-	-	-	-	-	1
P12	<i>Janibacter terrae</i> *	-	-	-	+	+	-	-	2
XT16	<i>Uncultured bacterium</i>	-	-	-	+	+	+	-	2
P17	<i>Microbacterium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	0
P18	<i>Gordonia westfalica</i> *	-	-	+	-	-	+	-	2
XT19	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	-	-	+	-	-	1
XT21	<i>Arthrobacter pascens</i>	-	-	-	-	-	-	-	0
XT23	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	+	-	-	1
XT24	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	-	-	+	+	+	-	-	3
XT26	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	+	+	+	+	-	-	4
XT33	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	0
XT35	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	-	-	+	+	-	2
XT37	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	+	-	+	+	+	-	4
XT38	<i>Exiguobacterium acetylium</i>	-	-	-	-	+	-	-	1
XT39	<i>Micrococcus luteus</i> *	-	-	-	-	+	+	-	2
XT40	<i>Arthrobacter humicola</i>	-	-	+	-	+	-	-	2
XT41	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	0
XT43	<i>Uncultured pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	0
XT45	<i>Arthrobacter oxydans</i>	-	-	-	-	-	+	-	1
XT50	<i>Pseudomonas gessardii</i>	-	-	-	-	-	-	-	0
F74	Ni	-	+	+	-	+	-	-	3
F76	<i>Streptomyces</i> sp.*	-	+	+	+	-	-	-	3

Não identificado (Ni), produção de quitinases (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 de Fosfatase (P), produção do composto (+), não produz o composto (-), Numero total de compostos produzido (N° C.P) *Identificada por Wille (2013). **Avaliações realizadas no presente estudo.

Tabela modificada e adaptada de Wille (2013).

Além de algumas bactérias possuírem a capacidade de realizar o controle biológico, elas uma vez presentes na rizosfera das plantas podem promover o aumento do crescimento das plantas, isso sendo devido à capacidade de solubilizar nutrientes que estão presentes no local. Desta forma além de atuar no controle biológico irão fornecer nutrientes para as plantas,

e, uma vez as plantas estando bem nutridas estarão mais resistentes ao ataque de pragas (LUZ, 1996; ENEBAK et al., 1998)

Embora os 22 isolados bacterianos relacionados na (Tabela 2), tenham sido submetidos a apenas dois testes para verificação de sua capacidade de produção de compostos, estes demonstraram baixa capacidade de promoção do crescimento, onde 91% desde isolados não produziram nenhum tipo de compostos. Os isolados XT 14 (*Pseudomonas* sp) e XT57 (Não identificado) foram capazes de solubilizar apenas um dos compostos, fosfato e potássio, respectivamente.

Tabela 2 – Identificação de bactérias isoladas de rochas de folhelhos pirobetuminosos (XT) e contaminantes (FC) e sua capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento de plantas.

Isolados bacterianos	Identificação	P	K	N° C. P.
XT14	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	1
XT20	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	-	-	0
XT22	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	-	-	0
XT36	<i>Exiguobacterium acetylium</i>	-	-	0
XT51	Ni	-	-	0
XT52	Ni	-	-	0
XT53	Ni	-	-	0
XT54	Ni	-	-	0
XT55	Ni	-	-	0
XT56	Ni	-	-	0
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
FC75	<i>Pseudomonas koreensis</i>	-	-	0
FC78	<i>Pseudomonas stutzerin</i>	-	-	0

Não identificada (Ni), produção de fosfatase (P), degradação de potássio (K), produção do composto (+), não produz o composto (-), e, número total de compostos produzido (N° C.P.).

A capacidade de solubilizar fosfato é de grande valia uma vez que esse mineral esta 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* e *Acacia holosericea* inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato. Semelhantemente Chabot et al. (1996) avaliando microrganismos solubilizadores de fosfato, como *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminosarum*, verificaram a promoção de crescimento em alface e milho, proporcionando aumentos na absorção de fosfato da ordem de 6 e 8 %, respectivamente.

Semelhantemente ao fósforo, 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 mudas de cana-de-açúcar tratadas com rizobactérias.

Dos 48 isolados bacterianos testados, apenas cinco obtiveram a nota máxima (3) na escala de avaliação da intensidade de colonização. Sendo as rizobactérias XT38, XT 10, XT56, P17, XT51, XT33, XT23, XT39, XT26, XT63, XT53, XT52 e XT37 (Tabela 3), 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, diferindo estatisticamente dos demais. Todas as outras rizobactérias apresentaram capacidade de colonizar o sistema radicular das plântulas de cana-de-açúcar apresentando, porém, variações e menor intensidade.

O método de seleção *in vitro* é um método simples para identificar a capacidade da bactéria de colonizar o sistema radicular, sendo muito utilizado a 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 mudas produzidas em cultura de tecidos e posteriormente microbiolizadas.

Tabela 3 – Intensidade de colonização radicular de bactérias isoladas de rochas folhelhos pirobetuminosos e microbiolizadas em plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB008347 cultivadas *in vitro* sendo avaliadas aos oito dias após a microbiolização com isolados bacterianos.

Tratamento	Intensidade	Tratamento	Intensidade
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
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

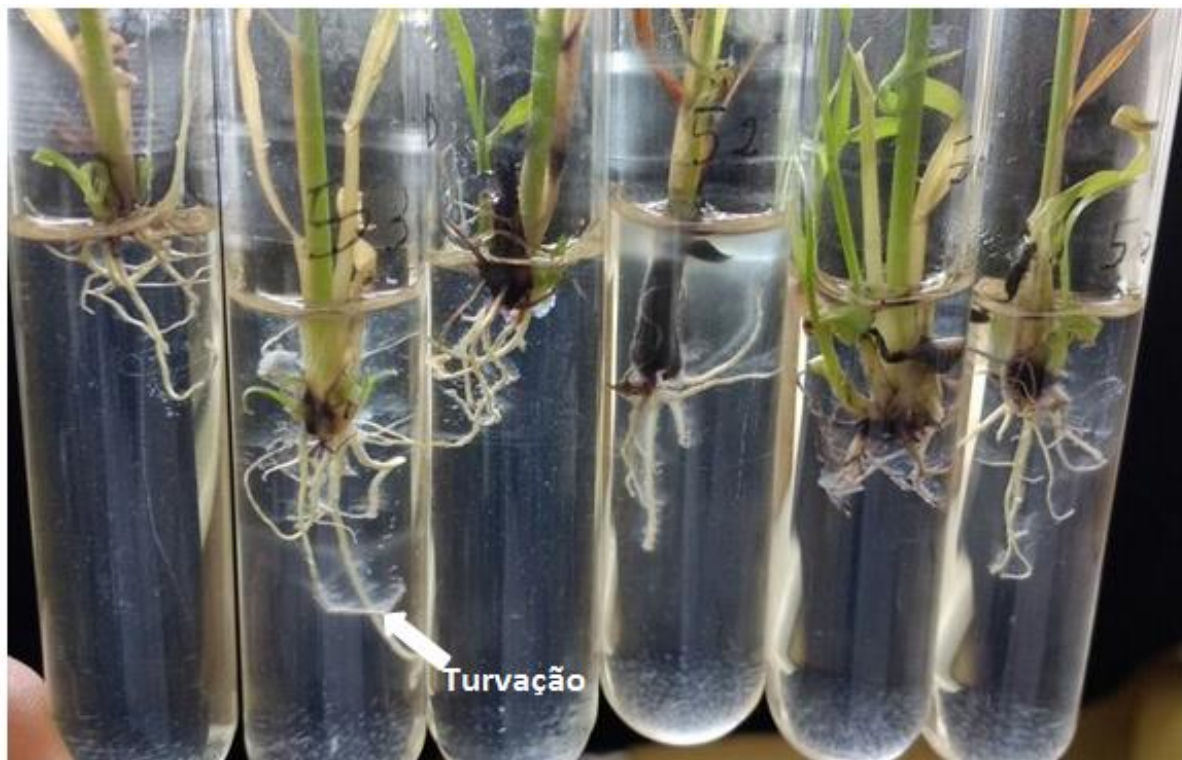
*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

A avaliação *in vitro* da capacidade de colonização e intensidade (Figura 2), proporcionam uma forma rápida e eficiente de avaliação 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. Sendo este método uma forma de se obter resultados de uma elevada quantidade de bactérias em um curto intervalo de tempo. Sottero (2006) em seus estudos em alface ao testarem a colonização de 64 bactérias em alface, verificou que apenas oito isolados colonizaram, tendo uma eficácia de 12,5% de seus isolados, além de haver também 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 por alguns isolados sendo eles *Paenibacillus lentimorbus* – 17, *P. lentimorbus*-24, *P. lentimorbus*-69, *B. punilus* – 60, *B. subtilis*-34 e *Bacillus* sp.-34 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.

Embora o método de colonização radicular *in vitro* possa ser considerado uma importante ferramenta para a seleção de agentes benéficos para as plantas, pois a rizosfera é o ambiente ideal para o desenvolvimento desses biocontroladores, sendo que essa colonização pode trazer benefícios no crescimento, controle de fitopatógenos entre outros (MOTTA, 2012; COELHO et al., 2007), não é garantia que estas bactérias promoveram crescimento e que possuem 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 Efeito da inoculação de rizobactérias sob parâmetros vegetativos da cana-de-açúcar.

Neste ensaio buscou-se avaliar o efeito das rizobactérias sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar, sem a interferência de fitonematoides. Com relação à altura das plantas, observou-se diferenças significativas apenas nos tratamentos XT 56 e testemunha, as quais apresentaram os menores valores de altura de planta comparados aos demais tratamentos (Tabela 4).

Nas variáveis massa fresca de parte aérea e peso de raiz, obteve-se resultados semelhantes, onde observou-se diferenças significativas apenas nos tratamentos testemunhas, com os menores índices, 1,006 e 0,528 gramas, respectivamente (Tabela 4). Semelhantemente, Girio et al. (2015) em trabalho utilizando bactérias promotoras de crescimento, avaliando o seu efeito sobre a formação de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, observaram que os tratamentos inoculados com bactérias apresentaram o índice de velocidade de brotação superior em relação aos demais, isto devido a capacidade que algumas bactérias possuem de sintetizar diferentes fitorreguladores de crescimento podendo favorecer as brotações.

Assim, das bactérias selecionadas *in vitro* que foram inoculadas nas plantas 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).

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, porém 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.

Tabela 4 – Efeito das bactérias 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*	2,626 a	1,296 a	463,64 a	92 ab	555,64 ab
XT23	75,4 a	2,512 a	1,406 a	372,96 ab	84,04 ab	457 ab
XT39	73,8 a	2,66 a	1,342 a	383,88 ab	82,32 ab	466,2 ab
XT33	70,8 a	2,326 a	1,606 a	317,88 b	83,28 ab	401,16 b
P17	70 a	2,738 a	1,31 a	367 ab	83,24 ab	450,24 ab
XT26	68,2 a	2,682 a	1,566 a	361,12 ab	74,44 b	435,56 b
XT51	69,8 a	2,25 a	1,048 ab	499,56 a	100,48 a	600,04 a
XT56	53,6 b	2,602 a	1,744 a	361,12 ab	83,24 ab	496,56 ab
TAS	45,8 b	1,006 b	0,528 b	184,08c	46,2 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, observou-se comportamentos diferenciados entre os tratamentos, porém, pode-se salientar que todos os tratamentos com a presença de rizobactérias proporcionaram teores superiores de clorofila em relação à testemunha, sem inoculação, em todos os tipos de clorofila avaliados (Tabela 4). Cabe ainda salientar o fato de 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.

A redução da síntese da clorofila e aminoácidos essenciais reflete diretamente no desenvolvimento e rendimento da cultura da cana-de-açúcar (BOLOGNA-CAMPBELL 2007). 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 o tratamento XT37 como um dos mais eficientes considerando os parâmetros em conjunto, tendo sido observados valores elevados em todas as

variáveis, demonstrando que esta rizobactéria possui grande influência sobre o desenvolvimento vegetal da cana de açúcar.

3.4 Avaliação dos isolados de rizobactérias in vitro sobre a eclosão e mortalidade de *Meloidogyne javanica*

Atualmente, já existem diversos trabalhos que comprovam a eficiência do uso de rizobactérias no controle de fitonematoides, sendo, porém, ainda necessária maior investigação sobre os efeitos das diferentes espécies e estirpes que podem ocorrer, naturalmente ou isoladas artificialmente.

Observando-se os resultados apresentados na (Tabela 5) é possível notar diferenças no efeito que cada bactéria promove sobre os nematoides. Isto pode ser atribuído aos compostos que cada bactéria produz, e em que fase do desenvolvimento do nematoide estes compostos agem, podendo interferir tanto na fase de ovo como na fase de juvenil/adulto.

Tabela 5– Percentagem da inibição da eclosão e mortalidade *M. javanica* frente a seis isolados bacterianos, avaliados em 24h e no 12º dia, respectivamente e mantidas sob incubação a 26°C.

Tratamento	Inibição eclosão %	Mortalidade J2 %
XT21	61,25 a*	1,25 bc
XT37	54,125 ab	0 c
XT23	51,075 ab	0 c
XT39	46 bc	2,375 bc
XT38	39,15 cd	4,8 b
As	34,05 d	0,5 c
XT10	20,6 e	84,925 a
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).

As bactérias que promoveram a maior redução da eclosão foram XT21, XT37 e XT23, apresentando 61,25, 54,125 e 54,075%, respectivamente, de inibição da eclosão (Tabela 5), caracterizando-se estes isolados como ovicidas. Todavia, no teste de mortalidade apenas uma das bactérias apresentou resultados satisfatórios, que foi o tratamento com a bactéria XT 10, onde observou-se 84,93 % de mortalidade dos juvenis de segundo estágio

(Tabela 5), deixando evidente que os compostos produzidos por cada bactéria possui 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 diversas 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% para os isolados BT-10, BT-14, BT-16 e BT-64 mesmo após 96h da aplicação do tratamento, já para a mortalidade J2 de *M. Javanica* a avaliação ocorreu após 24h e também chegou a 100% para BT-16 e BT-64 . Lopes (2011) também avaliando a eficiência de quatro isolados de *Bacillus* sp. sendo 3 isolados de *Bacillus punilus* e um isolado de *Bacillus* sp. obteve elevada eficiência no controle de J2 de *M. javanica* alcançando eficiência de 100% para o isolado *Bacillus* sp . Alves et al.(2011) ao avaliar *in vitro* a ação de 20 isolados de rizobactérias sobre a eclosão e a motilidade 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 (*Serratia liquefaciens*) foi uma das que se destacaram na produção de compostos, produzindo 4 dos 6 compostos avaliados (Tabela 1) e também alta intensidade de colonização radicular (Tabela 3), justificando seu potencial ovicida, entretanto, esses compostos não demonstraram efeito sobre 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, à 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 o efeito das bactérias sobre a mortalidade dos juvenis a bactéria 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), indicando a presença de outras estratégias para biocontrole diferentes daquelas aqui estudadas. Ruanpanun et el. (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 de crescimento e no biocontrole de *Meloidogyne javanica*

A infestação de plantas com nematoides formadores de galhas consiste em um grande problema fitossanitário, uma vez que a presença destes nematoides associados às plantas resulta em perdas qualitativas e quantitativas, diminuindo a eficiência das plantas cultivadas, reduzindo sua lucratividade. Sabe-se que o uso de algumas rizobactérias pode diminuir os efeitos negativos da infestação com nematoides, seja através do controle da população do mesmo, ou através da promoção de condições melhores às plantas.

No presente estudo, observou-se pouco efeito antagonico das rizobactérias ao nematoide, pois em geral, em todas as plantas de cana-de-açúcar microbiolizadas este se reproduziu, onde apenas os isolados XT39 e XT 38 reduziram o número de galhas e a reprodução de *M. javanica* em 39 e 38%, respectivamente (Tabela 6). Todavia, pode-se observar que as demais bactérias utilizadas promoveram incremento no número de galhas, apresentando valores maiores em relação à testemunha inoculada. Em estudo semelhante Freitas et al. (2005) avaliando o potencial de seis rizobactérias no controle de *M. javanica* em tomateiro observou que nem uma conseguiu promover o crescimento das plantas, mas alguns de seus isolados foram capaz de reduzir o número de galhas de *M. javanica*, porém não de *M. incognita*, caracterizando a especificidade no controle. 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	35,643ab	35,345a	-	-
Test. Salina	126 a	8,054b	20,92 c	24,08b	415,6b	78,81a
XT 23	128 a	11,084 ^a	32,762 ab	34,048a	631,2 ^a	46,32b
XT 39	135 a	10,825 ^a	32,225 ab	39,23a	411,16b	48,44b
XT 37	135,4 a	10,706 ^a	36,898 a	36,548a	594,4 ^a	65,21a
XT 10	135,16 a	10,625 ^a	30,12 b	34,72a	598,5 ^a	53,17b
XT 38	125,66 a	10,52a	30,40 b	33,93a	404,875b	48,69b
XT 21	133,5 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 *Meloidogyne incognita* em tomateiro observou que 15 dos seus isolados reduziram concomitantemente o número de galhas, massa de ovos e ovos por grama de raiz, no entanto 3 bactérias utilizadas não foram eficientes na redução do número de galhas mas reduziram a massas de ovos e ovos por grama de raiz.

Junior et al. (2010) avaliando o efeito da microbiolização de sementes de arroz no controle de *Meloidogyne graminicola* observou que todos os tratamentos reduziram o numero de galhas com uma variação de 30 a 70% em relação a testemunha, porém apenas quatorze tratamentos proporcionaram a redução do fator de reprodução que variou entre 31 a 62%.

Os resultados apresentados na (Tabela 6) demonstram o potencial do uso de rizobactérias na cultura da cana-de-açúcar, pois as plantas microbiolizadas, não diferiram da testemunha quanto à altura, porém diferiram nos parâmetros diâmetro do colmo e massa fresca de parte aérea e massa fresca de raiz, mesmo sendo observado a reprodução do nematoide, caracterizando a interação da planta com a bactéria. Em estudo semelhante

realizado por Ferreira (2015) avaliando a eficiência de diferentes espécies de *Bacillus* sp. e do nematicida carbofurano 350 sc (5L/ha) no controle de *M. javanica* e *M. incognita*, observou que ambos promoviam aumento no número de perfilhos da cana, mesmo não controlando a multiplicação dos nematoides. Colaborando com isso, Junior et al. (2010) menciona que realizando trabalhos de microbiolização de sementes de arroz com bactérias obteve incremento médio de 18 % de matéria seca de parte aérea em dez tratamentos. Sendo a ação das bactérias concentra principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento das plantas, atuando na produção de fitormônios como ácido indol acético – AIA – (PATTEN, GLICK, 2002), além de outros compostos indólicos, bem como etileno (THULER et al., 2003a, b), citoquininas e giberelinas.

O melhor potencial para o biocontrole de *M. javanica* foi apresentado pelo isolado XT 39 (*Micrococcus luteus*), pois foi o único que proporcionou redução na reprodução e número de galhas, assim como promoção no crescimento (Tabela 6), o que pode ser atribuído a sua capacidade de colonização radicular (Tabela 3) e produção de amônia e fosfatase (Tabela 1). 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 seletiva 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 cana-de-açúcar cultivada em solo infestado com *Pratylenchus zae*

De acordo com os dados da (Tabela 7), os isolado de rizobactérias apresentaram diferenças quanto a sua capacidade de promoção de crescimento de plantas onde o aspecto positivo da microbiolização das mudas somente foi observado em alguns tratamentos. O maior perfilhamento foi proporcionado pelo isolado XT39 e o maior crescimento de plantas pelos isolados XT33 e XT 23, quando comparado com as testemunhas com e sem nematoides.

O potencial destes isolados está provavelmente correlacionado com o fato de todos terem apresentado 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).

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 o tratamento P17 proporcionou os maiores valores (Tabela 7), ficando inclusive, muito superior aos tratamentos testemunhas, tanto como e sem a presença de *Pratylenchus zaeae*. No entanto, Wille (2013) em seu estudo observou redução significativa no teor de clorofila de figueira microbiolizada com rizobactérias e inoculadas com *M. incognita*, caracterizando os danos causados por essas pragas. Loveys e Bird (1973) também constataram a sensibilidade deste parâmetro, uma vez que, plantas infectadas por fitonematoides reduziram seu teor de clorofila.

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

Tratamento	Nº perfilho	Altura (cm)	Cloro A	Cloro B	Cloro T
XT 39	6,17 a*	144,75 bc	300,16 ab	93,29 a	393,45 b
XT 33	3 b	163,08 a	298,83 ab	93 a	391,83 b
XT23	3 b	159,83 a	300,21 ab	90,16 a	390,37 b
P17	2,5 bc	136,25 c	338,42 a	112,41 a	474,16 a
XT37	2,17 bc	135 c	301,083 ab	99,33 a	400,41 b
XT26	1,17bc	149,91 b	3012,5 ab	97,83 a	400,33 b
TSNe	2 bc	140,2 bc	292,54 bc	102,83 a	388,70 b
TCNe	1,16 c	148,5 b	256,51 c	100,40 a	342,39 c
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)

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 saudas e infectadas. Assim demonstrando a sensibilidade do teste clorofila A, para a identificação do estado fisiológico da planta.

4- CONCLUSÃO

Alguns isolados bacterianos provenientes de raízes de figueira e rochas de folhelhos pirobetuminosos são capazes de produzir compostos relacionados ao biocontrole e a promoção do crescimento.

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

A maioria das bactérias avaliadas possuem potencial como agentes de microbiolização de mudas de cana-de-açúcar, apresentando níveis de intensidade de colonização radicular. As rizobactérias XT37 e XT23, isoladas de rochas de folhelhos pirobetuminosos evidenciaram potencial promissor no biocontrole de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar.

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, ago, 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 zae*. **Revista Arquivos do Instituto Biológico** 78 : 557-564, . 2011.
- BARBOSA, B. F. F. **Agressividade comparada de *Pratylenchus brachyurus* com *P. zae* 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.
- BARRA, V. R.; SILVA, R. da; FERRAZ, H. G. M.; MACAGNAN, D.; SILVA, H. S. A.; MOURA, A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. de A.; MENDONÇA, H. L., VIEIRA JÚNIOR, J. R. Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de Plantas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.121-126, 2008.
- BIRD, A. F.; McCLURE, M. A. The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. **Parasitology**, v.72, p.19-28, 1976.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 553, 1981.
- BOLOGNA-CAMPBELL, I. **Balanco de nitrogênio e enxofre no sistema solo-ca-de-açúcar no ciclo de cana-planta**. Tese apresentada para obtenção do titulo 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.

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.

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.

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**, Brasília, v 50, n.1, p.33-43, jan. 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**, Brasília, 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.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

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**, Brasília, v.45, n.11, p.1259-1267, nov. 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**, 42(4): 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**, Cuyo, v. 32, p. 188-192, 1997.

LEE, T. S. G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, 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*, New York, v.3, p.525-529, 1973.
- LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 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**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.
- MARTINS, G. D.; GALO, M. L. B. T. Caracterização espectral da cana-de-açúcar infectada por nematoides e *mgdulus fryanus* por espectrorradiometria de campo. **BCG - Boletim de Ciências Geodésicas**, v.21, n 4°, p 783-796, Curitiba, 2015.
- MISKO, A.L.; GERMIDA, J.J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, Canadá, v. 42, p. 399-407, 2002.
- 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. Deleterious 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**, Copenhagen , 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.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 68, n. 8, 3795-3801, 2002.

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**, Nederland, 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**, Curitiba, PR, v. 35, n. 2, mai./ago. 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.

STIRLING, G. R.; MANKAU, R. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Dactylella oviparasitica*. **Journal of Nematology**, v;11, p.282-288, 1979.

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

THULER, D.S.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; BARBOSA, H.R. *Beijerinckia derxii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 799-806, 2003a.

THULER, D.S.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; BARBOSA, H.R. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 174-178, 2003b.

TIKHONOV, V. E.; LÓPEZ-LLORCA, L. V.; SALINAS, J.; JANSSEN, H-B. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamyosporium* 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 folhos 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).

