

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade**



**Dissertação**

**Fitonematoides nas culturas do arroz irrigado e do morangueiro: biocontrole, promoção de crescimento, agressividade de populações e reação de cultivares**

**DANIELE DE BRUM**

**Pelotas, 2017**

**DANIELE DE BRUM**

**Fitonematoides nas culturas do arroz irrigado e do  
morangueiro: biocontrole, promoção de crescimento,  
agressividade de populações e reação de cultivares**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Fitossanidade,  
Universidade Federal de  
Pelotas como requisito à  
obtenção do título de Mestre  
em Fitossanidade (área do  
conhecimento: Fitopatologia)

Orientador: Dr. Cesar Bauer Gomes

Coorientador: Dr<sup>a</sup>. Danielle Ribeiro de Barros

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B893f Brum, Daniele de

Fitonematoídes nas culturas do arroz irrigado e do morangueiro: biocontrole, promoção de crescimento, agressividade de populações e reação de cultivares. / Daniele de Brum; Cesar Bauer Gomes, orientador; Danielle Ribeiro de Barros, coorientadora. — Pelotas, 2017.

112f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. *Oryza sativa*. 2. Nematoides fitoparasitas. 3. Bactérias promotoras de crescimento. 4. Controle biológico. 5. *Fragaria xananassa*. I. Gomes, Cesar Bauer, orient. II. Barros, Danielle Ribeiro de, coorient. III. Título.

CDD : 633.18

Banca Examinadora:

Dr. Cesar Bauer Gomes – Embrapa Clima Temperado

Dr.<sup>a</sup> Glaucia de Figueiredo Nachtigal – Embrapa Clima Temperado

Dr. Ismail Teodoro Souza Júnior – FAEM/PPGF UFPel

Dr. Jerônimo Vieira de Araújo Filho - FAEM/DFS UFPel

A minha mãe Beatriz.

**OFEREÇO E DEDICO**

## Agradecimentos

A Universidade Federal de Pelotas e a Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, pela formação e grandes oportunidades oferecidas;

A Capes pela concessão da bolsa de mestrado;

A Embrapa Clima Temperado pela disponibilidade de estrutura para condução dos experimentos e ao projeto Xisto Agrícola pelo financiamento do projeto;

Ao orientador Cesar Bauer Gomes, pelos bons exemplos e ensinamentos, amizade, dedicação, confiança.

A todos os professores que contribuíram com minha formação, desde o primário até o mestrado;

A minha mãe, Beatriz Missio, primeira professora, obrigada pelo amor, educação, bons exemplos, incentivo aos estudos e todo esforço para me ver feliz;

A meu irmão, Dionatan de Brum, pela lealdade e amizade, companheirismo, apoio e incentivo em todos os momentos e minha sobrinha Isadora por sempre me fazer pensar em um futuro melhor;

Ao Marco pelo companheirismo e amizade, compreensão e por ser tão especial sempre; A Renata Zanella, que se tornou uma irmã, sempre atenciosa e prestativa;

Aos amigos que estão distantes, mas sempre presentes nas melhores lembranças;

A querida amiga Diana Carolina Leiva Côrtes, orgulhosa filha da Colômbia. Obrigada por compartilhar tão bons momentos comigo, pelas conversas, risadas e a amizade!

A amiga Priscila Marchi por toda a positividade, boas energias e tão bons momentos em Pelotas.

Aos colegas e amigos do laboratório de fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, Cristiano Bellé, Danrley Pacheco, Fernanda Cruz, Jaqueline Schafer, Juliana Bretanha, Margareth Divers, Patrícia Grimberg e Victor Hugo Casa, por toda a ajuda, momentos de descontração e parceria.

Agradecimento especial aos amigos que já foram, Fernanda Cruz, Jaqueline Schafer e Victor Hugo Casa e os que vieram depois, Margareth Divers e Patrícia Grimberg ... a boa convivência fez os dias passarem muito rápido, vou sentir saudades sempre!

Aos colegas e amigos do departamento de fitossanidade, Alfonso Arellano, Carolina Neves, Johan Murcia, Juan Rivera, Ismail Souza, Júlia Fasolin, Keilor Dorneles, Monique Nascimento, Priscila Rossatto, Renata Moccellini, Silvia Maich, Vanessa Gonçalves, Victoria Moreira, Viviana Gaviria, Wellington. Rodrigues, pela parceria e bons momentos de convivência sempre;

Aos funcionários da Embrapa Clima Temperado Claudiomar Amaral e Gelson Krolow pela ajuda nos momentos necessários e boas risadas nestes anos de Embrapa.

## Resumo

Brum, Daniele. **Fitonematoides nas culturas do arroz irrigado e do morangueiro: biocontrole, promoção de crescimento, agressividade de populações e reação de cultivares**. 2017. 112f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Entre os problemas que afetam as culturas do arroz e do morangueiro, problemas decorrentes do parasitismo por fitonematoides podem resultar em sérios prejuízos. Com o intuito de selecionar rizobactéria para o biocontrole de *Meloidogyne graminicola* e promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado e morangueiro e, prospectar medidas de manejo baseadas na resistência genética a fitonematoides, o presente estudo foi dividido em três capítulos. No primeiro, objetivou-se isolar, selecionar e caracterizar rizobactérias quanto ao potencial para biocontrole de *M. graminicola* e promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado. No segundo, avaliou-se a agressividade e biocontrole de *M. graminicola* por rizobactérias em diferentes cultivares de arroz irrigado de cultivo convencional e pré-germinado, e, a seguir, o potencial dessas bactérias na produção de arroz irrigado associado ou não a incorporação de finos de xisto, em condições de campo. No terceiro capítulo, avaliou-se a reação de diferentes cultivares de morangueiro a a *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. e prospectou-se o potencial de rizobactérias na promoção de crescimento da cultura. Na primeira etapa, após o isolamento de bactérias de folhelhos pirobetuminosos, selecionou-se, em casa de vegetação, os isolados XT23 (*Micrococcus luteus*) e XT21 (*Arthrobacter pascens*) como potenciais agentes de biocontrole do nematoide das galhas e promotores de crescimento de plantas de arroz. A seguir, as rizobactérias selecionadas foram caracterizadas *in vitro* quanto a produção de enzimas e composto relacionados ao biocontrole e promoção de crescimento, bem como, quanto a sua atividade ovicida e nematicida sobre *M. graminicola*. O isolado XT21 esteve associado a produção de protease, auxina, quitinase e sideróforos; e, XT23, à produção de amônia, auxina, quitinase e sideróforos. Ambos isolados bacterianos apresentaram pequena atividade ovicida e nematicida sobre *M. graminicola* e foram capazes de colonizar *in vitro* as raízes de mais de 10 cultivares de arroz. Em ensaio conduzido em rizotron, observou-se redução significativa na reprodução de *M. graminicola*, incrementos na massa fresca da parte aérea e das raízes e, também, redução significativa no conteúdo das enzimas peroxidase e polifenoloxidase das plantas de arroz microbiolizadas com ambas bactérias. Na segunda parte do trabalho, selecionou-se a população de *M. graminicola* mais agressiva (Capão do Leão) e as duas cultivares de arroz irrigado mais suscetíveis (BRS Querência e SCS112), para posterior estabelecimento de ensaio de biocontrole com os isolados bacterianos XT21 e XT23, em casa de vegetação. Verificou-se que ambos isolados proporcionaram supressão do nematoide das galhas, porém não houve incremento de crescimento de plantas em relação a testemunha inoculada e não microbiolizada. No entanto, em condições de campo, verificou-se aumento significativo das variáveis relacionadas ao desenvolvimento e peso de sementes das plantas de arroz com ambas bactérias, associado ou não aos

finos de xisto, em comparação à testemunha não microbiolizada. Avaliando-se a reação das cultivares de morangueiro aos nematoides das galhas e das lesões, verificou-se que Festival, Monterrey, Camino Real, San Andreas, Camarosa, Oso Grande, Aromas e Albion foram resistentes ou imunes a *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *P. zaeae*, e, com exceção de 'Camarosa' e 'Oso Grande', todos demais genótipos foram resistentes a *M. hapla*. Avaliando-se o desenvolvimento de mudas de morangueiro cvs. Diamante, Festival e Camarosa microbiolizadas com as rizobactérias XT21 e XT23, verificou-se que a segunda promoveu aumento da massa fresca da parte aérea e das raízes dos morangueiros, independentemente da cultivar, muito embora os dois isolados tenham colonizado as raízes de todas as cultivares em bioensaios *in vitro*.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, nematoides fitoparasitas, bactérias promotoras de crescimento, controle biológico, *Fragaria x ananassa*.



## Abstract

Brum, Daniele. **Plant parasitic nematodes in irrigated rice and strawberry crops: biocontrol, plant growth promoting, aggressiveness and cultivar reaction.** 2017. 112f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Among the problems affecting rice and strawberry crops, problems arising from nematode parasitism can result in serious damages. In order to select rhizobacteria for the biocontrol of *Meloidogyne graminicola* and plant growth promoting of irrigated rice and strawberry plants besides prospecting management measures based on genetic resistance to plant parasitic nematodes, the present study was divided into three chapters. In the first, the objective was to isolate, select and characterize potential rhizobacteria for *M. graminicola* biocontrol and to promoting growth of irrigated rice plants. In the second, it was evaluated the aggressiveness and biocontrol of *M. graminicola* by rhizobacterias in different cultivars of conventional and pre-germinated irrigated rice and to study the potential of these bacteria in irrigated rice production associated or not with the incorporation of oil shale by product under field conditions. In the third chapter, the reaction of different strawberry cultivars to *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus* spp. was evaluated and subsequently the potential for promoting rhizobacteria growth in strawberry cultivars was investigated. In the first part, after isolating bacteria from pirobotuminous shale, the isolates XT23 (*Micrococcus luteus*) and XT21 (*Arthrobacter pascens*) were selected as potential biocontrol agents of root-knot nematode and plant growth promoters of rice. Next, these selected bacteria were characterized *in vitro* as to the production of enzymes and compounds related to the biocontrol and growth promoting, as well as, for their ovicidal and nematicidal activity on *M. graminicola*. The bacterial isolate XT21 was associated with the production of protease, auxin, chitinase and siderophores; and, 'XT23', related to production of ammonia, auxin, chitinase and siderophores. Both bacterial isolates presented small ovicidal and nematicidal activity on *M. graminicola* and were able to colonize the roots of more than 10 rice cultivars. In the rizotron test, it was verified significant reduction in *M. graminicola* reproduction and increases in the fresh weight of shoots and roots besides a significant reduction in the content of the peroxidase and polyphenoloxity enzymes in rice plants microbiolized with both bacteria. In the second part of this study, the most aggressive *M. graminicola* population (Capão do Leão) and the irrigated rice cultivars more susceptible (BRS Querência and SCS112) were selected, for subsequent establishment of biocontrol test with bacterial isolates XT21 and XT23, at greenhouse conditions. Both isolates provided suppression of the root-knot nematode, but there was no increment on plant growth compared to the inoculated and non-microbiolized control. However, under field conditions, there was a significant increase in the plant development and the weight rice seeds using both bacteria, associated or not to the oil shale by product comparing to the non-microbiolized control. Evaluating the reaction of strawberry cultivars to the root-knot and to root-lesion nematodes, all genotypes were resistant or immune to *M. javanica*, *M. incognita*, *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaei*; exception of 'Camarosa' and 'Oso Grande' strawberry cultivars,

the other genotypes were resistant to *M. hapla*. Evaluating the development of strawberry seedlings cvs. Diamond, Festival and Camarosa previously microbiolized with the rhizobacteria XT21 and XT23, it was verified that the second promoted an increase of the fresh mass of the aerial part and roots from the strawberry plants, independently of the cultivar although the two bacterial isolates colonized the roots of all the cultivars in the *in vitro* biotests.

Keywords: Plant parasitic nematodes, biological control, plant growth promoting bacteria, *Oryza sativa*, *Fragaria x ananassa*.

## Lista de Figuras

### Capítulo I

Figura 1 Produção de auxina (ug AIA/mL) pelos isolados bacterianos XT21 e XT23 e a prova em branco (testemunha). \*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.....39

Figura 2 Penetração e desenvolvimento de *M. graminicola* (Mg) em plantas de arroz irrigado BR IRGA 410 provenientes da microbiolização com os isolados bacterianos XT21 e XT23 comparativamente a testemunha (sementes tratadas com água salina-AS) por 31 dias em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12h luz.....44

Figura 3 Parte aérea e sistema radicular de plantas de arroz irrigado BR IRGA 410 oriundas de sementes microbiolizadas com os isolados bacterianos XT21 e XT23, comparados a testemunha tratada com solução salina.....46

Figura 4 Colonização de raízes de arroz irrigado para sistema convencional cv. BRS Querência pelo isolado bacteriano XT21 (a); e, colonização radicular de cultivares de arroz pré-germinado, da esquerda para a direita: Testemunha (Solução salina) e cultivares EPAGRI 109 e EPAGRI 112 com o isolado bacteriano XT21 (b).....51

### Capítulo II

Figura 5 Plantas de arroz inoculadas com *Meloidogyne graminicola*, e mantidas sob condições de alagamento, em casa de vegetação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.....58

Figura 6 Plantas de arroz irrigado, cultivar BRS IRGA 410 não infectadas com *Meloidogyne graminicola*/testemunha (A) e infectadas com as populações P1 proveniente de Capão do Leão-RS (B); P2 de Santa Maria-RS (C); e, P3 de Camboriú-SC (D).....64

### Capítulo III

Figura 7 Sistema radicular de plantas de morangueiro exibindo sintoma de galhas causadas por *Meloidogyne arenaria* em cultivar Camarosa (a) e *Meloidogyne hapla* na cultivar Oso Grande (b). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2017.....82

Figura 8 Colonização *in vitro* de raízes de mudas de morangueiro (esquerda para direita), das cvs. Camarosa, Festival e Diamante, pelas rizobactérias XT21 e XT23.....84

## Lista de Tabelas

### Capítulo I

Tabela 1 Biocaracterização dos isolados bacterianos XT21 e XT23 quanto à capacidade de produzir compostos relacionados ao controle biológico de nematoides e à promoção de crescimento de plantas.....	39
Tabela 2 Percentagem da mortalidade e eclosão de J2 de <i>M. graminicola</i> pelos isolados bacterianos XT21 e XT23, avaliados em 24h e no 15º dia após o estabelecimento dos tratamentos, a 25°C, respectivamente.....	43
Tabela 3 Biocontrole de <i>Meloidogyne graminicola</i> e promoção do crescimento de plantas de arroz BR IRGA 410 oriundas de sementes microbiolizadas com os isolados bacterianos XT21 e XT23.....	47
Tabela 4 Atividade enzimática de peroxidase, polifenol-oxidase e fenilalanina em folhas e raízes das plantas de arroz BR IRGA 410 previamente microbiolizadas com os isolados rizobacterianos XT21 e X23 e inoculadas com <i>Meloidogyne graminicola</i> , em comparação com a testemunha (tratamento das sementes com solução salina).....	48
Tabela 5 Colonização radicular de sementes de 16 cultivares de arroz irrigado para o sistema convencional microbiolizadas com os isolados bacterianos XT21 e XT23 em comparação com o controle cujas sementes foram tratadas com solução salina.....	51
Tabela 6 Colonização radicular de sementes de três cultivares de arroz irrigado para o sistema pré-germinado microbiolizadas com os isolados bacterianos XT21 e XT23 em comparação com o controle cujas sementes foram tratadas com solução salina.....	52

### Capítulo II

Tabela 7 Número de galhas e fator de reprodução de <i>Meloidogyne graminicola</i> em cinco cultivares comerciais de arroz irrigado e pré-germinado infectadas com três populações de <i>M. graminicola</i> . População P1 (Santa Maria, RS), população P2 (Capão do Leão, RS) e população P3 (Balneário Camboriú, SC). Pelotas, RS.....	63
Tabela 8 Massa fresca da raiz e da parte aérea em plantas de arroz infectadas com três populações de <i>M. graminicola</i> . População P1 (Santa Maria, RS), população P2 (Capão do Leão, RS) e população P3 (Balneário Camboriú, SC) Pelotas, RS.....	64
Tabela 9 Número de galhas e fator de reprodução de <i>M. graminicola</i> em duas cultivares comerciais de arroz irrigado inoculadas com rizobactérias. Pelotas, RS.....	67
Tabela 10 Massa fresca das raízes de plantas de arroz irrigado proveniente de sementes microbiolizadas com rizobactérias e inoculadas com <i>M. graminicola</i> , independentemente da cultivar. Pelotas, RS.....	70
Tabela 11 Massa fresca da parte aérea e número de perfilhos/planta de plantas de arroz irrigado proveniente de sementes microbiolizadas com rizobactérias e inoculadas com <i>M. graminicola</i> independentemente da cultivar. Pelotas, RS.....	70
Tabela 12 Diâmetro do caule, altura, peso da parte aérea, raiz e sementes de plantas de arroz BRS Querência submetidas ou não à tratamento com as rizobactérias XT23 e XT21, em parcelas incorporadas ou não com finos de xisto. Pelotas, RS.....	71

### **Capítulo III**

Tabela 13 Reação de cultivares de morangueiro a diferentes espécies de nematoide das galhas e das lesões radiculares. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.....	82
Tabela 14 Colonização radicular <i>in vitro</i> de raízes de mudas de morangueiro das cvs. Camarosa, Festival e Diamante pelas rizobactérias XT21 e XT23 em comparação com as respectivas testemunhas cujas raízes foram tratadas com solução salina.....	84

Tabela 15 Massa fresca de raiz e da parte aérea em três cultivares de morangueiro independentemente da microbiolização das raízes com bactérias.....85

Tabela 16 Massa fresca de raiz e da parte aérea em mudas de morangueiro previamente microbiolizadas com duas bactérias, independentemente da cultivar de morangueiro.....86

## Sumário

1	Introdução geral.....	19
2	CAPÍTULO I – Bioprospecção e potencial de rizobactérias no controle de nematoide das galhas <i>Meloidogyne graminicola</i> e na promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado.....	25
2.1	Introdução.....	25
2.2	Material e Métodos.....	28
2.2.1	Coleta de amostras de rocha para isolamento de microorganismos relacionados ao biocontrole de fitonematoide.....	28
2.2.2	Isolamento de microorganismos de folhelhos pirobetuminosos.....	29
2.2.3	Seleção <i>in vivo</i> de bactérias biocontroladoras do nematoide das galhas ( <i>Meloidogyne graminicola</i> ) e promotoras de crescimento de plantas de arroz irrigado.....	29
2.2.4	Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos selecionados <i>in vivo</i> quanto à capacidade de biocontrole de <i>Meloidogyne graminicola</i> e promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado.....	28
2.2.5	Prospecção do mecanismo de ação dos isolados selecionados no biocontrole de <i>M. graminicola</i> em arroz irrigado 'BR IRGA 410'.....	32
2.2.5.2	Estudo do ciclo biológico de <i>M. graminicola</i> em plantas de arroz irrigado provenientes da microbiolização com os isolados bacterianos selecionados.....	33
2.2.5.3	Potencial dos isolados bacterianos selecionados no biocontrole de <i>M. graminicola</i> , promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado e influência no conteúdo de enzimas relacionado à resistência a doenças.....	34
2.2.6	Avaliação do potencial de colonização radicular <i>in vitro</i> de sementes de diferentes cultivares de arroz irrigado pelos isolados bacterianos selecionados.....	35
2.3	Resultados e discussão.....	36
2.3.1	Isolamento de microorganismos de rochas de folhetos pirobetuminosos.....	36
2.3.2	Seleção <i>in vivo</i> de microorganismos para o biocontrole do nematoide das galhas, <i>Meloidogyne graminicola</i> .....	37



2.3.3	Caracterização bioquímica dos microorganismos selecionados <i>in vivo</i> para o biocontrole de <i>Meloidogyne graminicola</i> e promoção de crescimento de plantas de arroz .....	41
2.3.4	Prospecção do mecanismo de ação dos isolados selecionados no biocontrole de <i>M. graminicola</i> em arroz irrigado BR IRGA 410.....	44
2.3.4.1	Avaliação do potencial de isolados bacterianos selecionados quanto ao efeito nematicida e ovicida sobre <i>M. graminicola</i> .....	44
2.3.4.2	Estudo do ciclo biológico de <i>M. graminicola</i> em plantas de arroz irrigado provenientes da microbiolização com os isolados bacterianos selecionados.....	46
2.3.5	Potencial dos isolados bacterianos selecionados no biocontrole de <i>M. graminicola</i> , promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado e influência no conteúdo de enzimas relacionado à resistência a doenças.....	48
2.3.6	Avaliação do potencial de colonização radicular <i>in vitro</i> de sementes de diferentes cultivares de arroz irrigado pelos isolados bacterianos selecionados.....	52
2.4	Conclusão .....	56
3	CAPÍTULO II – Agressividade de populações de <i>Meloidogyne graminicola</i> em cultivares de arroz irrigado, controle biológico do nematoide das galhas e promoção de crescimento pelo uso de rizobactérias .....	57
3.1	Introdução .....	57
3.2	Material e Métodos .....	60
3.2.1	Agressividade de populações de <i>Meloidogyne graminicola</i> em diferentes cultivares de arroz irrigado .....	60
3.2.2	Controle Biológico de <i>M. graminicola</i> pelo uso de rizobactérias .....	62
3.2.3	Eficiência de rizobactérias no desenvolvimento de plantas e produção de sementes de arroz irrigado.....	63
3.3	Resultados e Discussão.....	64
3.3.1	Agressividade de populações de <i>Meloidogyne graminicola</i> a diferentes cultivares de arroz irrigado .....	64
3.3.2	Controle biológico de <i>M. graminicola</i> pelo uso de rizobactérias .....	68
3.3.3	Eficiência de rizobactérias no desenvolvimento de plantas e produção de sementes de arroz irrigado.....	73
3.4	Conclusão.....	75
4	CAPÍTULO III – Avaliação da resistência genética de cultivares de morangueiro ao nematoide das galhas e das lesões radiculares e prospecção do emprego de rizobactérias na promoção de crescimento da cultura .....	77

4.1	Introdução .....	77
4.2	Material e Métodos .....	79
4.2.1	Avaliação da resistência de cultivares de morangueiro a <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Pratylenchus</i> spp.....	79
4.2.2	Avaliação <i>in vitro</i> da colonização radicular de raízes de morangueiro por rizobactérias selecionadas para o biocontrole de <i>M. graminicola</i> e promotoras de crescimento de plantas de arroz .....	80
4.2.3	Avaliação do desenvolvimento de plantas de morangueiro microbiolizadas com rizobactérias quanto à promoção de crescimento .....	81
4.3	Resultados e Discussão.....	82
4.3.1	Avaliação da resistência de cultivares de morangueiro a <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Pratylenchus</i> spp.....	82
4.3.2	Avaliação <i>in vitro</i> da colonização radicular de raízes de morangueiro por rizobactérias selecionadas para o biocontrole de <i>M. graminicola</i> e promotoras de crescimento de plantas de arroz. ....	85
4.3.3	Avaliação do desenvolvimento de cultivares de morangueiro microbiolizadas com rizobactérias quanto à promoção de crescimento .....	86
4.4	Conclusão .....	89
5	Conclusão Geral .....	90
6	Referências.....	91

## 1 Introdução geral

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de alimentos e possui enorme potencial para expandir suas áreas em desenvolvimento da agricultura. O país é líder na produção de grãos, carne, frutas e hortaliças. A agricultura familiar e o agronegócio são os responsáveis por alimentar uma nação de aproximadamente 200 milhões de habitantes e equilibrar o sistema econômico do país através das exportações.

Entre os cereais, o arroz (*Oryza sativa*, L) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar para mais de três bilhões de pessoas ao redor do mundo (IRGA, 2014). O local exato de sua origem não é preciso, mas muitos historiadores afirmam ser originado de regiões que hoje incluem a China e Índia, na Ásia. Os árabes introduziram o arroz no continente europeu, na Península Ibérica, e de lá se difundiu pela Europa e chegou na América através dos colonizadores espanhóis e portugueses (AGROLINK, 2016).

Ao redor do mundo, o arroz é o segundo cereal mais cultivado, ocupando área de aproximadamente 162 milhões de hectares, e, produção de 748 milhões de ton. (FAOSTAT, 2014), sendo o continente asiático responsável por mais de 90% da produção mundial. Possui importância socioeconômica em países subdesenvolvidos da Ásia, África, América Latina e Caribe. Os maiores produtores mundiais de arroz são a China (189 milhões de ton.), seguido da Índia (134 milhões de ton.) e Indonésia (55 milhões de ton.), (FAOSTAT, 2014). Na América do Sul o Brasil é o principal produtor, participando com cerca de 79,3% da produção do Mercosul, seguido pelo Uruguai, Argentina e Paraguai (CONAB, 2017). No Brasil, a maior produção vem do sistema irrigado nas várzeas da região Sul do país, tendo como principal produtor o estado do Rio Grande do Sul, com área de 1.120,085ha e produtividade média de 7.700

Kg/ha e produção de 8 540 078 ton. de grãos (IBGE, 2017). O cultivo do cereal em terras altas encontra boas condições nas regiões Centro Oeste e Norte do Brasil, tendo como principais produtores os estados de Goiás, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, porém a área de sequeiro teve retração na última safra devido a competição da área com a soja, que possui maior rentabilidade.

Para garantir boa produção e alta rentabilidade os agricultores enfrentam alguns desafios, entre eles problemas fitossanitários ocasionam as principais perdas na cultura do arroz. Patógenos de solo, os nematoides causam ao redor do mundo, perdas de 10 a 25% em lavouras orizícolas (BRIDGE; PLOWRIGHT; PENG, 2005). Mais de 30 gêneros são relatados na cultura do arroz ao redor mundo, Fortuner e Merny (1979), Prot e Matias (1995). Os nematoides são encontrados em diferentes sistemas de cultivo, mas a diversidade e a distribuição de gêneros e espécies dependem do sistema adotado (PROT; RAHMAN, 1994).

Os nematoides das galhas são considerados os de maior importância econômica na agricultura e os que causam os maiores danos no cultivo do arroz (KYNDT, 2014). Entre as espécies de nematoides das galhas, *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, 1965 é a que causa maiores prejuízos nas lavouras arrozeiras (PADGHAM, 2004). *M. graminicola* já foi relatada no Sudeste Asiático, China, Sul da África, no Estados Unidos e, na América Latina, foi encontrado em regiões da Colômbia e Brasil. Recentemente, Fanelli e colaboradores (2017) relataram a primeira ocorrência de *M. graminicola* na Europa, em lavouras arrozeiras do Norte da Itália. No Rio Grande do Sul, este fitoparasita foi relatado pela primeira vez por Sperandio e Monteiro, em 1991, na cultura do arroz. O primeiro levantamento do nematoide das galhas em arroz irrigado no Brasil foi realizado por Steffen et al. (2007), no Rio Grande do Sul, onde os autores detectaram a presença de *M. graminicola* (Est. VS1) na totalidade das lavouras arrozeiras avaliadas na depressão central do estado. Logo depois, Gomes et al. (2009) relataram a presença de *M. graminicola* nas lavouras de arroz irrigado em Santa Catarina.

Em trabalho recente, Negretti et al. (2017) verificaram que *M. graminicola* é a espécie predominante em lavouras arrozeiras do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. No entanto, os autores observaram a presença de

três populações atípicas de *Meloidogyne* sp. em lavouras de arroz irrigado no Sul do Brasil, onde uma delas, presente em Santa Catarina, foi previamente caracterizada como *M. oryzae* Maas, Sanders & Dede, 1978, uma espécie exótica em nossas condições.

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são vermes endoparasitas, sedentários muito especializados, o seu ciclo de vida inicia com a penetração do juvenil no interior das raízes. Uma vez que ocorre a penetração o mesmo induz a formação de engrossamentos anormais nas raízes das plantas, provocados pelo aumento das células no entorno de seu sítio de alimentação (hipertrofia) com a posterior multiplicação exagerada das células formando os tumores (galhas) à volta do tecido parasitado (GOMES, 2013). A partir de então, ocorre um dreno de nutrientes para esses sítios de alimentação, provocando o enfraquecimento das plantas parasitadas.

Em arroz irrigado a penetração do juvenil de segundo estágio (J2) nas raízes ocorre antes da entrada da lâmina de água na lavoura. A partir daí o nematoide forma o sítio de alimentação e se reproduz sem sofrer danos pela falta de oxigênio ocasionado em função da inundação da área (SORIANO et al., 2003). O ciclo de vida de *M. graminicola* é rápido e pode ser completado em 19-27 dias, dependendo das condições do solo. Após 15 dias de infecção as fêmeas iniciam a postura de ovos no córtex da raiz. As fêmeas adultas de *M. graminicola* se mantem no interior das raízes e ali fazem a postura dos ovos, sendo uma estratégia de sobrevivência já que o hospedeiro está em condições de alagamento (MANTELIN et al., 2017). Nessas circunstâncias, o nematoide completa várias gerações em um único ciclo da cultura o que pode contribuir para o definhamento das plantas infectadas, mesmo sob de condições de alagamento do solo (FANELLI et al., 2017).

Plantas de arroz seriamente afetadas por *M. graminicola* apresentam retardamento do crescimento e redução do número de perfilhos. As folhas tornam-se, muitas vezes, murchas e amareladas, consequência da dificuldade da planta em absorver água e nutrientes através da raiz. O principal sintoma ocorre no sistema radicular das plantas que adquire aspecto de cabo de guarda-chuva nas pontas, os quais são engrossamentos popularmente conhecidos como galhas (GOMES et al., 1997; STEFEN et al., 1997).

Considerando-se a falta de cultivares de arroz resistentes a *M. graminicola* no mercado brasileiro e a ausência produtos químicos registrados para a cultura no MAPA (AGROFIT, 2017), torna-se difícil o controle deste patógeno. Nesse sentido, o estabelecimento de estratégias de manejo do nematoide das galhas em áreas afetadas utilizando-se do controle biológico, apresenta como aspectos positivos o baixo custo econômico e ambiental, porém, ao contrário do controle químico, raramente é espetacular (BETTIOL, 1991). Várias características são necessárias para que ocorra o sucesso do controle biológico, entre elas a seleção de bons agentes de controle biológico é fundamental. Para isto, os organismos potenciais necessitam apresentar rápido desenvolvimento, produzirem estruturas de resistência e antibióticos, e, ainda o crescimento do antagonista precisa ser em larga faixa de temperatura e ocorrer termoestabilidade e estabilidade dos metabólitos produzidos, além de adaptação às diversas condições ambientais (FERRAZ et al., 2010).

No cenário da produção de frutas no Brasil, o cultivo do morangueiro, *Fragaria x ananassa* (Duch), é destaque em função de sua importância econômica e social (ANTUNES et al., 2010). No Brasil, o desenvolvimento da cultura ganha destaque na região Sudeste, sendo o estado de Minas Gerais o principal produtor, seguido de São Paulo e Rio Grande do Sul (ANTUNES et al., 2014). Assim como ocorre com o cultivo do arroz, durante o desenvolvimento do morangueiro, muitas vezes os agricultores se deparam com entraves relacionados a doenças e pragas que atacam as plantas. Entre esses, fitonematoides dos gêneros *Meloidogyne* (nematoide das galhas) e *Pratylenchus* (nematoide das lesões radiculares), quando presentes em elevadas infestações no solo, podem afetar seriamente o desenvolvimento das plantas parasitadas (MAAS, 1998; GOMES, 2003). *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 é a espécie mais importante na cultura do morangueiro, principalmente em regiões temperadas e do mediterrâneo (BROWN et al, 1993), já tendo sido relatada no Brasil, nas regiões Sul e Sudeste (SILVEIRA et al, 1989). Além de *M. hapla*, no Brasil há relatos da presença de *M. arenaria* (GOMES, informação pessoal) parasitando a cultura. Porém, em alguns países de clima tropical, o morangueiro pode ser afetado por *M. javanica* (Treub) Chitwood, 1949 e *M. incognita* (Kofoid e Whit) Chitwood, 1949, (RASKI e

KRUSBERG, 1984). Para o controle desta praga, a principal estratégia de manejo é o uso de material resistente. Porém, pouco se conhece sobre a reação das cultivares de morangueiro as principais espécies do nematoide das galhas e das lesões de maior ocorrência (LIMA et al., 2014); e, em nossas condições, não há nematicida com registro de uso para a cultura (AGROFIT, 2017). Nesse sentido, o emprego de práticas de manejo de fitonematoides como a biofumigação do solo e o uso de microorganismos biocontroladores tem demonstrado algum potencial (ERTUK, et al., 2012). No entanto, poucos estudos são conduzidos na cultura utilizando rizobactérias para incrementar a produção e ou no manejo de tais pragas na referida hortaliça.

O arroz e o morangueiro são culturas de importância socioeconômica para o Brasil, no entanto, os fitonematoides são uma ameaça por serem patógenos largamente distribuídos, bastante polípagos e, de difícil controle. Pouco se sabe sobre a agressividade de populações de *M. graminicola* em arroz e a reação genética de morangueiro frente a espécies de *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, assim como também existem poucos dados acerca do potencial de rizobactérias no controle de nematoides e na promoção de crescimento das culturas aqui relatadas.

Bactérias da rizosfera, denominadas rizobactérias, apresentam grande potencial na redução de fitopatógenos do solo (SOUZA JUNIOR et al., 2010) onde o uso destes microorganismos consiste em ativar mecanismos de defesa da planta ou parte desta (AGRIOS, 2005). Nesse sentido, rizobactérias têm sido usadas com sucesso em várias interações planta x nematoides com resultados benéficos no controle de doenças e no incremento ao desenvolvimento de plantas (FABRY et al., 2007; ALMAGHRADI et al., 2013). Segundo Souza Junior et al. (2010), para o patossistema nematoide das galhas x arroz irrigado, o uso e/ou a combinação de rizobactérias proporcionaram aumento do espectro de ação no controle de *M. graminicola* associado a promoção de crescimento conforme já relatado em outros estudos (PADGHAM; SOKORA, 2006; SEENIVASAN, 2012;). Da mesma forma, trabalhos evidenciando o uso de rizobactérias em morangueiro, tem demonstrado benefícios no desenvolvimento das plantas e no biocontrole do nematoide das lesões (DUNIWAY et al., 2003; ERKUT et al., 2012; HACKENBERG et al.,

1997). No entanto, existe pouca informação na literatura abordando aspectos práticos e potenciais de bactérias promotoras de crescimento de plantas ou PGPR (termo utilizado em inglês para plant growth promoting rhizobacteria) em ambas as culturas não só pela abordagem relacionada ao rendimento das culturas, mas também aos dos mecanismos de ação relacionados aos respectivos patossistemas.

Dessa forma, o presente estudo foi dividido em três capítulos: No primeiro, objetivou-se isolar e selecionar rizobactérias provenientes de folhelhos pirobetuminoso, quanto ao biocontrole de nematoides e promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado, além de caracterizar biologicamente esses isolados quanto a produção de compostos relacionados ao biocontrole e promoção de crescimento, bem como prospectar os mecanismos de ação das rizobactérias no biocontrole do nematoide das galhas no arroz irrigado. No segundo capítulo, o objetivo foi estudar a agressividade de diferentes populações de *M. graminicola* em diferentes cultivares comerciais de arroz irrigado e avaliar o potencial de rizobactérias para o controle biológico do nematoide das galhas, em condições de casa de vegetação e a campo. E, no terceiro, objetivou-se avaliar a reação de cultivares de morangueiro a diferentes espécies, *Meloidogyne* sp. e *Pratylenchus* sp. e prospectar o potencial de rizobactérias selecionadas anteriormente na promoção de crescimento da cultura.



## **2 CAPÍTULO I – Bioprospecção e potencial de rizobactérias no controle de nematoide das galhas *Meloidogyne graminicola* e na promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado.**

### **2.1 Introdução**

O arroz cultivado (*Oryza sativa* L.) é originário da Ásia e é o segundo mais importante cereal destinado à alimentação humana, ficando atrás apenas do trigo. A nível mundial, a cultura ocupa uma área de aproximadamente 162 milhões de hectares, cuja produção é de aproximadamente 748 milhões de ton. (FAOSTAT, 2017). Entre os países integrantes do Mercosul, o Brasil é o maior produtor, com 75,75% da produção do bloco e o maior consumidor com demanda de 11.691,2 ton. do produto (USDA, 2015).

Atualmente o Rio Grande do Sul (RS) é responsável por 2/3 de toda a produção do grão no país (CONAB, 2017) com área semeada na safra 2016/2017 de 1.120, 085 hectares com produtividade média de 7.700 Kg/ha e produção de 8 540 078 ton. de grãos (IRGA, 2016), no sistema irrigado, concentrados na metade Sul do estado. Além do RS, o estado de Santa Catarina é um importante produtor do grão no Brasil adotando o sistema pré-germinado, com produtividade média estimada para a safra 2016/2017 em 1. 102, 206 ton. e produtividade de 7.338 Kg/ha em área de 148,134 ha. Embora menor, a produção de arroz também é expressiva nas regiões Nordeste (MA e PI), Norte (RO, PA e TO), Centro-Oeste (MT e GO) e Sudeste (SP e MG) com produtividade média de 1675 Kg/ha, 3636 Kg/ha, 3661 Kg/ha e 3110 Kg/ha, respectivamente. (CONAB, 2015).

Entre os fatores que afetam o cultivo do arroz no Brasil e no mundo, problemas de ordem fitossanitária associados a doenças prejudicam

seriamente a cultura, durante todo o seu ciclo, interferindo dessa maneira, na redução da produtividade e da qualidade dos grãos (LOBO et al., 2010). Dentre os patógenos causadores de danos na cultura, os fitonematoides são considerados sérios agravantes ao cultivo irrigado e de sequeiro. Mais de 35 gêneros e 130 espécies de nematoides são associados ao cultivo do arroz (PROT et al., 1995). Os nematoides são encontrados em diferentes sistemas de cultivo, mas a diversidade e a distribuição de gêneros e espécies dependem do sistema adotado (PROT & RAHMAN, 1994). O nematoide das galhas, *Meloidogyne graminicola*, é o principal nematoide causador de prejuízos na cultura do arroz irrigado (FANELLI et al., 2017). Da mesma forma, em nossas condições, *M. graminicola* é a espécie mais frequente. No entanto, também registra-se a ocorrência de *M. javanica*, *M. oryzae* e duas populações atípicas de *Meloidogyne* sp. em arroz irrigado na região Sul do Brasil (NEGRETTI et al., 2017; SOARES, 2017).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são vermes endoparasitas, sedentários, altamente especializados. Em raízes de arroz irrigado, a penetração do juvenil de segundo estágio (J2) ocorre antes da entrada da lâmina de água na lavoura; a partir daí o nematoide estabelece o sítio de alimentação e se reproduz sem sofrer danos pela inundação da área (SORIANO et al., 2003), retirando o oxigênio dos aerênquimas da planta. O ciclo de vida de *M. graminicola* é rápido e pode ser completado em 19-27 dias dependendo das condições do solo. Assim como ocorre com outras espécies do nematoide das galhas, os J2 de *M. graminicola* infectam as raízes das plantas e migram intercelularmente no córtex no sentido do ápice até atingir o cilindro vascular onde estabelecem um sítio de alimentação formado por 5 a 8 células gigantes (CABASAN et al., 2014; JENA; RAO, 1977) onde continuam se desenvolvendo até o final de seu ciclo de vida. As fêmeas adultas de *M. graminicola* se mantem no interior das raízes e ali fazem a postura dos ovos, sendo uma estratégia de sobrevivência já que o hospedeiro está em condições de alagamento (MANTELIN et al., 2017). Nesse sentido, vários ciclos do patógeno ocorrem no interior das raízes até a colheita dos grãos, que, dependendo da cultivar, o ciclo completo da planta pode variar entre 100 e 145 dias (KYNDT; FERNANDEZ; GHEYSEN, 2014).

Considerando-se a inexistência de variedades de arroz irrigado resistentes a *M. graminicola* disponíveis no mercado, a ampla gama de hospedeiros entre as espécies vegetais comuns nesses agrossistemas (NEGRETTI et al., 2014) e a carência de produtos químicos registrados para a cultura no Brasil (AGROFIT, 2017), torna-se essencial a busca por outras formas de manejo, sendo o controle biológico uma alternativa potencialmente viável (LUDWIG; MOURA 2007 ; SEENIVASAN, 2011).

Rizobactérias apresentam grande potencial na redução das populações de fitopatógenos do solo (SOUZA JUNIOR et al., 2010), onde o uso destes microorganismos consiste em ativar mecanismos de defesa da planta ou parte desta (AGRIOS, 2005). Assim, para o manejo de doenças de plantas, tem-se obtido sucesso com o emprego de rizobactérias, principalmente em epidemias causadas por nematoides (FABRY et al., 2007; ALMAGHRADI et al., 2013). Da mesma forma, estudos conduzidos por E et al. (2017) indicaram que a microbiolização de raízes e sementes com rizobactérias beneficia as plantas por induzirem a expressão de proteínas ligadas ao crescimento de plantas através de mecanismos como solubilização de fosfatos (VESSEI, 2003; KIM et al., 1998), produção de ACC-deaminase (ADAMS; YANG, 1979), produção de hormônios (BELIMOV et al., 2005), produção de sideróforos (PINTON. et al., 2008), entre outros.

Rizobactérias como agentes de controle biológico representam uma alternativa eficiente para suprimir o desenvolvimento de fitonematoides (ASHOUB; AMARA, 2010). Para que ocorra o controle destes patógenos de solo é necessário que as bactérias selecionadas produzam toxinas, enzimas hidrolíticas e outros compostos metabólicos que afetem o desenvolvimento reprodutivo do nematoide, assim como a eclosão de ovos e a sobrevivência dos juvenis (FREITAS et al., 2005). Seenivasan e colaboradores (2012) ao estudar a veiculação de *Pseudomonas fluorescens*, isolado ou em combinação com outros tratamentos em arroz irrigado, contra *M. graminicola*, observaram inibição da eclosão e atividade nematicida *in vitro* sobre os J2 do nematoide; e, o tratamento de sementes com combinação de isolados reduziu significativamente a infestação do nematoide, além de aumentar a

produtividade do arroz em até 24,7% sob condições de casa de vegetação e a campo.

A condução de trabalhos nessa linha de pesquisa pode resultar em informações importantes no estabelecimento de práticas de manejo desta praga, assim como também, gerar conhecimento sobre a forma como as rizobactérias podem incrementar a produção do cereal sem agressão ao ambiente no patossistema arroz irrigado x *M. graminicola*. Desta forma o objetivo deste estudo foi: a) isolar e selecionar rizobactérias provenientes de folhelhos pirobetuminoso quanto ao biocontrole de nematoides e promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado; b) caracterizar os isolados bacterianos quanto a produção de compostos relacionados ao biocontrole e promoção de crescimento; e, c) avaliar o potencial de rizobactérias no biocontrole de *M. graminicola* e na promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado.

## **2.2 Material e Métodos**

A primeira etapa do trabalho consistiu na coleta de amostras de folhelhos pirobetuminosos (rochas sedimentares de origem marinha vulgarmente conhecidas como xisto) em área de mineração da Six Petrobrás, no município de São Mateus do Sul, PR. O isolamento de microorganismos foi conduzida anteriormente e as demais etapas subsequentes, conduzidas nas dependências do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS.

### **2.2.1 Coleta de amostras de rocha para isolamento de microorganismos relacionados ao biocontrole de fitonematoides**

Foram coletadas 15 amostras de folhelhos pirobetuminoso na área de mineração da Petrobrás. Entre estas, quatro foram provenientes da camada superior da rocha matriz bruta (0-40 cm profundidade), quatro da camada inferior da rocha matriz bruta (40-80 cm profundidade), quatro de calcisto (calcário de xisto) e três de finos de xisto (co-produto proveniente do

peneiramento de rocha de xisto da camada superior e da camada inferior com granulometria inferior a 0,5 polegadas). No laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, as amostras foram preparadas para posterior diluição seriada, plaqueamento em meio de cultura apropriado e isolamento dos microorganismos associados.

### **2.2.2 Isolamento de microorganismos de folhos pirobetuminosos**

Primeiramente, cada amostra foi triturada e peneirada individualmente, e a seguir, 10 g de cada amostra foi transferida para Erlenmeyer (150mL) contendo 90mL de solução salina esterilizada sob agitação em agitador orbital (MARIANO; SOUZA, 2016), por 30 min, em banho de gelo (MILLER,1972). Foram obtidas suspensões a partir de diluição seriada, transferindo-se alíquotas de 1mL para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina, sucessivamente, até obtenção da diluição  $10^{-4}$ . A seguir, alíquotas de 100 $\mu$ L das suspensões, nas diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , foram semeadas em triplicatas, por espalhamento em placas de Petri contendo meio 523 Kado ; Heskett (1970) e incubadas a 28°C por 48h. Posteriormente, procedeu-se o crescimento das bactérias provenientes das amostras em meio 523 Kado ; Heskett (1970), sendo tais isolados preservados em glicerol 20% (v/v) em freezer a -20°C (MARIANO, SILVEIRA, 2005) e, na sequência, avaliados *in vivo* quanto ao potencial biocontrolador do nematoide das galhas e promotor de crescimento de plantas de arroz irrigado.

### **2.2.3 Seleção *in vivo* de isolados bacterianos com potencial para biocontrole de nematoide das galhas (*Meloidogyne graminicola*) e promotoras de crescimento de plantas de arroz irrigado.**

Cento e vinte e sete isolados bacterianos, divididos em cinco grupos conforme origem (G1 e G2-xisto bruto camada superior/XT; G3-xisto bruto camada inferior/XTI; G4- calxisto/CX; G5- finos de xisto/FX), foram previamente cultivados em meio 523 de Kado; Heskett (1970) por 24h. A seguir, foram preparadas suspensões com solução salina (NaCl 0,85%) para cada um dos

isolados cujas concentrações foram ajustadas em espectrofotômetro para  $A_{540} = 0,50$ . Posteriormente, sementes da cultivar de arroz BR IRGA 410, previamente desinfestadas com NaClO 0,5%, foram imersas nas suspensões da cada isolado bacteriano, separadamente, e, imediatamente, submetidas à agitação por 30 min a temperatura ambiente.

A seguir, realizou-se a semeadura em vasos plásticos com capacidade 700mL, contendo solo esterilizado. Após 15 dias da emergência das plântulas de arroz, procedeu-se o desbaste deixando-se uma planta de arroz por vaso. Cada planta foi inoculada com 3.000 ovos + J2 (juvenil de segundo estágio) de uma população pura de *M. graminicola* Est VS1 (população Santa Maria), mantida em plantas de arroz BR IRGA 410, em vaso com solo esterilizado, em casa de vegetação. O ensaio foi conduzido em delineamento completamente casualizado e constou de três repetições/tratamento bacteriano, mantendo-se a umidade do solo nos vasos em condição não saturada. Como testemunha, plantas de arroz da mesma cultivar, microbiolizadas apenas com solução salina, foram inoculadas com o mesmo nível de inóculo do nematoide. Decorridos 60 dias da inoculação, as raízes de cada planta foram separadas da parte aérea, lavadas e avaliadas quanto a massa fresca da parte aérea, sistema radicular e número de galhas/sistema radicular. A seguir, realizou-se a extração de ovos das raízes (HUSSEY e BARKER, 1973 modificado por Bonetti; Ferraz, 1981) para contagem do número de ovos e, posteriormente, determinação do fator de reprodução (FR) de *M. graminicola* (FR = população final/população inicial) em todos os tratamentos (OOSTENBRINCK, 1966).

Os valores da massa fresca da parte aérea e de raiz, número de galhas (transformados em  $\sqrt{x+1}$ ) e de FR de *M. graminicola*, nos respectivos tratamentos, foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade pelo programa SASM Agri (CANTERI et al., 2001).

#### **2.2.4 Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos selecionados *in vivo* quanto à capacidade de biocontrole de *Meloidogyne graminicola* e promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado**

Os isolados que apresentaram melhor resposta para o biocontrole de nematoides e promoveram o crescimento de plantas de arroz foram caracterizados bioquimicamente quanto à produção de enzimas e compostos relacionados ao biocontrole de nematoides e promoção de crescimento, conforme as metodologias abaixo:

##### **Produção de quitinase**

Para verificar a produção de quitinase pelos isolados bacterianos foi utilizado o método descrito por Catlelan (1999). Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura cuja única fonte de carbono foi a quitina, sendo logo após incubados à 28°C por 21 dias. As avaliações foram baseadas na presença de halo translúcido, ao redor da colônia bacteriana, indicativo da produção de quitinase.

##### **Produção de proteases**

Para avaliar o potencial proteolítico dos isolados foram utilizados dois substratos, Leite de Litmus® (Difco) e meio de gelatina a 5%. A avaliação da capacidade de hidrólise em Leite de Litmus® dos isolados foi realizada em tubos contendo 5 mL do meio. Os isolados foram repicados para os tubos, os quais, foram mantidos no escuro a 28°C por 10 dias. O tubo testemunha não recebeu adição de bactéria. Foram realizadas duas avaliações, aos quatro e dez dias, por meio da observação da alteração do meio leitoso para translúcido, indicando a capacidade da bactéria de hidrolisar o substrato (SCHAAD et al., 2001). De maneira similar, o potencial proteolítico dos isolados em meio contendo gelatina a 5% foi avaliado. Para isto, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de gelatina (Mariano; Silveira, 2005), os quais foram mantidos no escuro a 28°C durante 10 dias. No tubo testemunha não houve adição de bactéria. Foram realizadas duas avaliações, aos 4 e 10 dias. Para isto, os tubos foram colocados em geladeira a 4°C, por 30 min, e a capacidade de hidrólise de gelatina avaliada por meio da análise da alteração do estado do meio, sendo considerado resultado positivo aqueles tratamentos onde o meio se mostrou liquefeito e, negativo, aqueles onde o meio se mostrou sólido.

### **Produção de sideróforos**

Os isolados foram repicados para meio líquido King B (KING et al. 1954) (15mL) com e sem a suplementação de 100µL de sulfato ferroso ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  – 1%), sendo os mesmos incubados, sob agitação, a 28°C por 96 horas. Após este período, foram retirados 1000 µL, os quais foram centrifugados a 16000g por 20 min. Logo, foram retirados 400 µL do sobrenadante e adicionado a esta mesma suspensão, 400 µL de cromo azurol S (CAS). A alteração da coloração do meio para amarelo-avermelhado, é indicativo da produção de sideróforos (CATTELAN, 1999).

### **Produção de auxina**

A capacidade dos isolados selecionados de produzir auxinas foi determinada através de ensaio colorimétrico (GORDON & WEBER, 1951). As bactérias foram repicadas para frascos de 150mL, com 25mL de meio Tripticaseína de soja (TSB) a 10% suplementado com 150 mg/L de L-triptofano e incubadas durante três dias a 25°C, no escuro. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min e foi recolhido o sobrenadante, ao qual foi incorporado reagente de Salkowski [ $\text{FeCl}_3$  0,5 mol/L +  $\text{HClO}_4$  (35%)] na proporção de uma parte de reagente para duas de sobrenadante obtido. Os sobrenadantes tratados foram mantidos no escuro, durante 30 min, para reação de manifestação da cor vermelha. A quantidade de compostos indólicos produzida foi medida em espectrofotômetro (530nm), estimando-se a concentração de auxinas por meio de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas da forma sintética do hormônio ácido indol acético (de 0 a 100 µg/mL) em meio de cultura TSB 10%.

## **2.2.5 Identificação dos mecanismo de ação dos isolados**

### **2.2.5.1 Avaliação do efeito nematicida e ovicida *in vitro* dos isolados selecionados sobre juvenis de segundo estágio e ovos de *M. graminicola***

Para realização deste estudo foi utilizado apenas os isolados que apresentaram características bioquímicas compatíveis ao biocontrole e a promoção de crescimento. O objetivo foi avaliar o efeito nematicida e ovicida destes isolados em ensaio conduzido em placas de microtitulação. Para avaliar



o efeito nematicida, cada orifício da placa foi considerado como uma repetição, onde foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana ( $A_{540}= 0,50$ ) e 50 µL de uma suspensão aquosa contendo 30 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. graminicola* utilizando-se cinco repetições para cada tratamento. Orifícios de uma placa de ELISA contendo 50 µL de uma suspensão aquosa com 30 J2 do nematoide e 50 µL de solução salina foram utilizados com testemunhas.

A seguir, as placas foram vedadas com filme plástico e papel alumínio e mantidas em BOD, a 25°C, na ausência de luz. Decorrido 24h de incubação, avaliou-se o número e percentagem de J2 de *M. graminicola* mortos, após a adição de 10 µL de NaOH (1N) em cada cavidade. Foram considerados mortos, os J2 que permaneceram com o corpo completamente distendido, um minuto após a adição de NaOH (CHEN; DICKSON, 2000).

De forma semelhante ao bioensaio anterior, para avaliar o potencial dos isolados bacterianos quanto ao feito ovicida, cada orifício da placa foi considerado uma repetição no qual foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana ( $A_{540}= 0,50$ ) e 50 µL de uma suspensão aquosa contendo 30 ovos imaturos de *M. graminicola*. As testemunhas foram compostas de ovos imersos apenas em solução salina. Logo após, as placas foram vedadas com filme plástico e papel alumínio e mantidas em BOD, a 25°C, na ausência de luz. A percentagem de J2 eclodidos foi avaliada após 15 dias de incubação.

Posteriormente, os valores de percentagem de J2 de *M. graminicola* mortos e eclodidos, transformados em arco seno  $\sqrt{x/100}$ , foram submetidos à análise de variância e teste de Duncan a 5% de probabilidade pelo programa SASM Agri (CANTERI et al., 2001).

#### **2.2.5.2 Estudo do ciclo biológico de *M. graminicola* em plantas de arroz irrigado provenientes da microbiolização com os isolados bacterianos selecionados**

Plantas de arroz da cultivar BR IRGA 410 provenientes da microbiolização de sementes com os 127 isolados bacterianos previamente selecionados (metodologia detalhada no item 2.2.3), foram transplantadas para vasos plásticos com solo esterilizado sendo mantidas em fitotron a 25°C. Como

testemunhas foram utilizadas plantas de arroz microbiolizadas com suspensão salina.

Como inóculo utilizou-se uma população pura de *M. graminicola* mantida em plantas de arroz BR IRGA 410 das quais procedeu-se a extração de ovos e J2 conforme Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981), das raízes infectadas. A suspensão obtida foi transferida para peneira com papel filtro sob bandeja plástica conforme método do funil de Baermann modificado (CHRISTIE; PERRY, 1951) onde permaneceu em BOD a 25°C. Decorrido 24 h, os J2 eclodidos foram recolhidos para posterior utilização.

A seguir, cada planta de arroz, mantida em fitotron, foi inoculada com 1000 J2 de *M. graminicola*. Decorridos, 5, 10, 15, 20, 25 e 31 dias após a inoculação (DAI), separou-se o sistema radicular de três plantas por cada período de avaliação. Em cada avaliação, o sistema radicular das plantas de arroz foi lavado em água corrente e a seguir corado com fucsina ácida conforme metodologia descrita Byrd et al. (1983) e modificada por Gomes (2006). Na sequência, foram montadas lâminas com as raízes coradas para observação do número de nematoides penetrados e do seu desenvolvimento nas diferentes fases do ciclo de vida, ao longo do período de avaliação. A avaliação da interferência das bactérias no desenvolvimento do nematoide se deu pela observação do número de penetrados e a evolução dos estádios de desenvolvimento até os 31 dias, quando foi observado a presença de fêmeas maduras com massas de ovos nas raízes das plantas de arroz da testemunha.

#### **2.2.5.3 Potencial dos isolados bacterianos selecionados no biocontrole de *M. graminicola*, promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado e influência no conteúdo de enzimas relacionadas à resistência da planta a doenças**

A partir das plantas originadas de sementes de arroz irrigado BR IRGA 410 microbiolizadas com os 127 isolados bacterianos selecionados, procedeu-se o transplante para rizotrons de vidro (9,0 x 5,0 x 30,0cm) contendo solo esterilizado. A seguir, inoculou-se 5000 ovos e J2 de *M. graminicola*/planta. Como controle foram utilizadas plantas provenientes da microbiolização das

sementes de arroz com água salina. O ensaio foi conduzido em delineamento completamente casualizado e constou de quatro repetições por tratamento.

Decorridos 50 DAI, cada planta foi removida do rizotron e procedeu-se a pesagem da massa fresca da parte aérea e das raízes de cada planta. A seguir, coletou-se uma amostra de 2g de folhas e das raízes de cada planta de arroz dos diferentes tratamentos para análise da atividade das enzimas peroxidase (PO) e polifenol oxidase (PFO) (CAMPOS et al., 2004) e, de fenilalanina amônia-liase (HYODO e YANG, 1971; HYODO et al., 1978), cujos valores obtidos foram expressos em  $UE \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$  de tecido.

Posteriormente, o sistema radicular de cada planta foi lavado e avaliado quanto ao número de galhas (transformados em  $\sqrt{x+1}$ ). Logo em seguida procedeu-se à extração de ovos + J2 das raízes de cada planta (HUSSEY E BARKER (1973) modificado por BONETTI; FERRAZ, 1981) para determinação da população final e determinação do fator de reprodução do nematoide (OOSTEMBRINK, 1966). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade

#### **2.2.6 Avaliação *in vitro* do potencial de colonização de sementes de arroz irrigado por XT 21 e XT23 previamente selecionados**

Para avaliar a capacidade das bactérias selecionadas em colonizarem o sistema radicular de plântulas de arroz, foram conduzidos dois experimentos em esquema fatorial com 10 repetições, em delineamento completamente casualizado.

No primeiro grupo, 12 cultivares de arroz irrigado, próprias para o sistema de cultivo convencional (BRS Querência, Fronteira, Pelota, CNA 1077, BR IRGA 410, Taim, Atalanta, BRA 040081, CNA 10756, Firmesa, Bojuru, Chui, BRA 01455, BRA 030008, Ligueirinho, BRA 050099) foram testadas. Para a microbiolização dos diferentes genótipos, inicialmente procedeu-se a desinfestação das sementes com álcool 92%, durante 5 min após submersão com hipoclorito de sódio a 2%, durante 15 min, seguidas de três lavagens sucessivas com água esterilizada. A seguir, as sementes foram submetidas à

microbiolização com cada uma das suspensões bacterianas previamente preparadas e ajustadas em espectrofotômetro ( $A_{540} = 0,50$ ), por um período de 30 min em mesa de agitação. Como testemunhas, sementes das mesmas cultivares de arroz foram imersas somente em solução salina a 1%. Após a microbiolização, as sementes foram colocadas para germinar em tubos de ensaio esterilizados contendo Gelright (1,5%), conforme descrito por Queiroz et al. (2006). A seguir, os tubos foram mantidos em câmara de crescimento a 28°C. Posteriormente, um segundo grupo, composto de três cultivares de arroz irrigado pré-germinado (SCS112, EPAGRI109 e EPAGRI112) foram testadas quanto à percentagem de colonização radicular pelas rizobactérias, conforme detalhado anteriormente.

Diariamente, cada tubo foi observado quanto à presença de colonização radicular pela rizobactéria, atribuindo-se notas de 0 a 3 conforme 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).

A partir dos valores de índices de colonização radicular, no ensaio com as cultivares convencionais, os valores foram submetidos a ANOVA, sendo as médias dos valores de colonização entre as cultivares, dentro de cada bactéria, comparados entre si pelo teste de Scot Knott a 5%; e, dentro de cada cultivar, comparando-se os tratamentos bacterianos com o controle (testemunha) pelo teste de Duncan a 5% probabilidade, utilizando-se o programa SASM. Os valores obtidos no ensaio com as cultivares de sistema pré-germinado foram submetidos a ANOVA, em esquema fatorial, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade utilizando-se o programa SAS.

## **2.3 Resultados e discussão**

### **2.3.1 Isolamento de microorganismos de rochas de folhetos pirobetuminosos**

Foram isolados 127 bactérias das diferentes amostras. Destes, 37

bactérias foram provenientes de amostras da camada superior da rocha bruta, 40 da camada inferior, 27 das amostras de calcisto, e, 21 provenientes das amostras de finos de xisto. Entre estes, observou-se maior número de bactérias, seguido de actinobactérias, sendo todas as colônias repicadas para tubos com meio de cultura 523 (Kado; Hesketh, 1970), em BOD a 8°C. Os isolados também foram preservados em glicerol 10% (p:v) a -20°C conforme Qualling (1960) modificado por Alfenas; Mafia (2016) e mantidos na coleção de rizobactérias do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado.

O solo e as rochas são ambientes complexos, local de desenvolvimento de inúmeros microorganismos, onde diversas interações acontecem. A rizosfera é uma região do solo, rica em matéria orgânica, onde ocorre a maioria das interações entre microorganismos e plantas, devido a exsudatos liberados pelas raízes. Actinobactérias são organismos de crescimento lento e baixa atividade competitiva e não predominam a rizosfera, pois outros organismos se beneficiam por possuírem capacidade de colonização mais elevada. Estudos com actinobactérias são importantes pois estes microorganismos são capazes de sintetizar antibióticos, agindo como antagonistas no biocontrole de fitopatógenos e, formam esporos e conídios que aumentam sua sobrevivência em situações adversas (PEREIRA, J. C, 2000). Moura, A. B ; Romeiro, R. S. e Neves, M. C. P. (1998) testaram o potencial de de 190 isolados de actinobactérias oriundos de diferentes habitats contra *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro e verificaram que 18 isolados foram capazes de controlar 100% da doenças causada pela bactéria, demonstrando grande potencial para o emprego no controle biológico de doenças de plantas. Souza, C. S et. al. (2006) verificaram que utilizando os metabólitos produzidos por 6 isolados de estreptomicetos, para infestar o substrato de produção de mudas de tomateiro, ocorreu a redução de 68% no número de galhas e 76% no número de massa de ovos de *M. incognita*.

### **2.3.2 Seleção *in vivo* de microorganismos para o biocontrole do nematoide das galhas, *M. graminicola***

A seleção de bactérias biocontroladoras de *M. graminicola* e promotoras de crescimento de arroz irrigado foi realizada através da condução de

experimentos realizado nos cinco grupos avaliados, conforme detalhado no item 2.2.3. Detectou-se a presença de isolados bacterianos biocontroladores do nematoide das galhas em arroz irrigado em todos os grupos; e, isolados promotores de crescimento, naquelas plantas de arroz inoculadas apenas com as bactérias provenientes da rocha bruta da camada superior (G1 e G2) e inferior (G3) (Apêndice A).

Conforme apêndice A, nos grupos 1 e 2, composto por 37 tratamentos, (rocha bruta camada superior), três isolados bacterianos (XT16, XT23 e XT27) promoveram o crescimento da parte aérea e das raízes das plantas de arroz; além de proporcionarem redução do número de galhas nas raízes e supressão do nematoide em relação as testemunhas não microbiolizadas ( $P < 0,05$ ). Avaliando-se os efeitos separadamente, para promoção de crescimento, 18 isolados resultaram em aumento da massa fresca da parte aérea e, 16 em aumento da massa fresca das raízes; no entanto apenas oito dessas bactérias (XT02, XT15, XT16, XT23, XT24, XT27, XT29 e XT40) apresentaram incremento positivo para aumento significativo da massa fresca foliar (67,74-20,96%) e das raízes (45,63-102,91%), destacando-se o isolado XT23. Na avaliação dos isolados bacterianos desses dois grupos quanto à capacidade biocontroladora do nematoide das galhas, 18 isolados promoveram a redução do número de galhas, 20 isolados afetaram negativamente a população final número de ovos e 21 reduziram o fator de reprodução do nematoide, sendo que 12 (XT01, XT21, XT28, XT32, XT25, XT41, XT14, XT16, XT23, XT27, XT34 e XT39) foram capazes de reduzir o número de galhas em 36,29 a 97,77% e o fator de reprodução em percentuais que variaram entre 19,78 (XT38) a 99,36% (XT21).

Analisando-se o terceiro grupo, observou-se que o isolado XT16 proporcionou incrementos da massa fresca da parte aérea e de raiz em 25% e 40%, respectivamente. Já para biocontrole, este isolado apresentou redução de 49,21% no número de galhas, 46,99% na população final do nematoide e 47,7% no fator de reprodução. Para promoção de crescimento, 27 isolados foram efetivos para o peso da parte aérea e 9 para o peso de raiz; oito isolados (XTI03, XTI07, XTI16, XTI20, XTI21, XTI26, XTI36 e XTI32) aumentaram o peso da parte aérea entre 30,20 a 80,00% (XTI07 e XTI36) e, com relação ao

peso da raiz, proporcionaram aumento entre 35,00 a 55,00% (XTI21 e XTI26 e XTI09). Com relação ao biocontrole, 4 isolados reduziram o número de galhas (XT16, XTIT17, XTI19 e XT2I4). Além disto, a microbiolização das sementes de arroz irrigado com 30 isolados deste grupo, resultou na redução do fator de reprodução de *M. graminicola*, com destaque para os isolados XTI19 e XT2I4 que reduziram o número de galhas respectivamente, e o fator de reprodução em percentuais que variaram de 44,12 a 74,88% e 35,98 a 83,74%, respectivamente.

Dos 27 isolados bacterianos testados no grupo 4 (Calxisto), 14 deles (Apêndice A) proporcionaram a redução do número de galhas nas raízes de arroz (20,68 a 62,14%); e, apenas três (CX26, CX03 e CX10) resultaram na supressão do nematoide (11,84 a 27,88%). Porém, nenhum dos isolados promoveu crescimento das plantas de arroz.

No grupo 5, nenhum dos isolados bacterianos provenientes de finos de xisto demonstraram potencial para promoção de crescimento em plantas de arroz em relação a testemunha ( $P > 0,05$ ). Dos 26 isolados bacterianos, 16 deles proporcionaram redução do número de galhas (de 42,21 a 70,83%); porém apenas FN13 e FN14 controlaram o nematoide em relação a testemunha (37,21 a 41,57%) conforme valores de FR apresentados no apêndice A.

LUDWIG et al. (2012), avaliando o potencial de rizobactérias no controle de *M. graminicola* em arroz irrigado, verificaram que os isolados das espécies *Pseudomonas synxatha*, *P. fluorescens*, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* e *Stenotrophomonas malthophila* suprimiram a reprodução do nematoide das galhas em 29% (FR=52,7), valor muito abaixo daqueles observados no presente estudo. Da mesma forma, Souza Júnior et al. (2010), estudando a eficiência de rizobactérias no mesmo patossistema, observaram que a microbiolização de sementes de arroz com as rizobactérias, em combinações, proporcionou aumento do espectro de ação no controle de *M. graminicola* além de incremento no crescimento e desenvolvimento de plantas de arroz.

No presente trabalho, o isolado XT23, *Micrococcus luteus* (FLEMING, 1929), actinobactéria identificada e sequenciada molecularmente pelo rRNA 16S por Bisognin (2017), apresentou potencial de controle biológico contra

fitonematoides. Resultado semelhante encontrou Shahzad e colaboradores (2017) que, ao isolar bactérias do interior de sementes de arroz identificaram, entre outras cepas, *M. luteus*, e estudaram o potencial deste isolado quanto a produção de ácido indol acético e promoção de crescimento em plantas de arroz. Os autores verificaram que houve produção de IAA na faixa de 11.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  à 38.80  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , além da maioria dos parâmetros de crescimento de plantas como, comprimento de raiz, massa fresca da parte aérea e teores de clorofila terem aumentaram significativamente, quando comparado a testemunha.

O biocontrole do nematoide das galhas e o incremento no desenvolvimento das plantas de arroz pelo uso de rizobactérias, observado no presente trabalho, tem sido observado em outros estudos com espécies vegetais diversas. Anteriormente, Kloepper *et al.* (1992) isolaram bactérias da rizosfera de plantas antagonistas à nematoides e encontraram espécies que exibiam um antagonismo a *H. glycines* e *M. incognita* em soja, com predominância de isolados do gênero *Bacillus*. Outros estudos evidenciaram o uso de bactérias como biocontroladoras de *H. glycines* em soja, (TIAN *et al.*, 2000; TIAN ; RIGGS, 2000). Fator importante é que o controle biológico de fitonematoides é realizado por interferências em alguma etapa do ciclo de vida do nematoide e não é de atuação direta sobre o organismo, fato esse comprovado por Araújo *et al.* (2002) em ensaios com *Bacillus subtilis* no controle de *H. glycines*.

Apesar do isolado XT21, *Arthrobacter pascens* (LOCHHEAD e BURTON 1953), actinobactéria identificada e sequenciada molecularmente pelo rRNA 16S por Bisognin (2017), não ter promovido o crescimento das plantas de arroz, foi o único tratamento que controlou *M. graminicola*, reduzindo o FR abaixo de 1,00, (FR=0,29). Porém isso não impede que o mesmo seja utilizado na microbiolização de sementes de arroz. A mesma situação foi relatada por Sikora (1988) que não observou incrementos significativos no peso de raízes e parte aérea em algodão e amendoim tratados com *Bacillus subtilis*, porém as plantas apresentaram alta atividade antagonista contra *Meloidogyne* e *Rotylenchus*. Esses fatos merecem atenção, devido à busca por agentes biocontroladores que tenham, a mesma habilidade que os tratamentos aqui



destacados, uma vez que potencializando o crescimento e o vigor em plantas, proporcionam indiretamente a bioproteção ou atuam diretamente aumentando a produção de hormônios como o ácido-indol-acético (VONDERWEL et al., 2001) ou auxinas (KOEPLER et al., 1990), o que as torna menos susceptíveis ao ataque de patógenos.

Levando-se em consideração a eficiência dos isolados bacteriano testados no biocontrole de *M. graminicola* e na promoção de crescimento das plantas de arroz, de uma forma geral, maiores níveis de controle (<FR) e maiores incrementos no desenvolvimento do arroz, foram observados para aquelas bactérias dos grupos 1 e 2 provenientes da rocha bruta de xisto. Nesse sentido, selecionou-se para a etapa seguinte, dentre esses, os isolados XT21 e XT23.

### 2.3.3 Caracterização bioquímica dos microorganismos selecionados *in vivo* para o biocontrole de *Meloidogyne graminicola* e promoção de crescimento de plantas de arroz

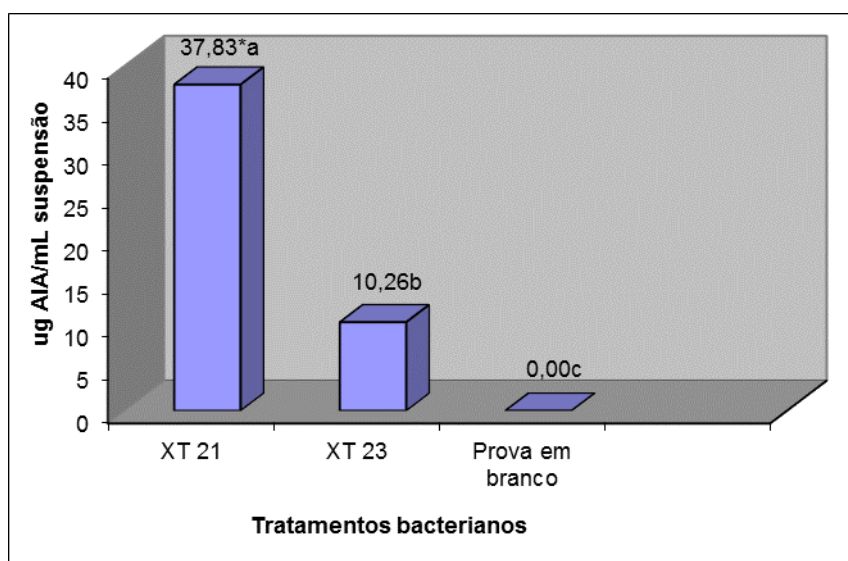
De acordo com os dados apresentados na tabela 1, nenhum dos isolados bacterianos foi capaz de produzir todos os compostos utilizando-se as metodologias testadas. Em relação aqueles compostos relacionados ao biocontrole de fitonematoides, XT21 e XT23 produziram quitinase, e sideróforos; e, separadamente, XT23 foi positivo para produção de amônia e, XT21 para protease. Em estudo conduzido *in vitro* por Wille (2013), com esses mesmo isolados bacterianos, a autora verificou que nenhum deles foi capaz de produzir enzimas líticas como a lipase.

**Tabela 1** - Biocaracterização de isolados bacterianos XT21 e XT23 quanto à capacidade de produzir compostos relacionados ao controle biológico de nematoides e a promoção de crescimento de plantas.

Isolados	Identificação	Q	PL	PG	L*	A*	P**	K**	Si	Auxina	Nº.C.P
XT21	<i>Arthrobacter pascens</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	4
XT23	<i>Micrococcus luteus</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	+	4

Produção de quitinase (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), solubilização de potássio (K), produção de sideróforos (Si), produção do composto (+), não produz o composto (-), Número total de compostos produzido (Nº C.P.); \* Wille (2013); \*\*Bisognin (2017).

Em relação a promoção de crescimento de plantas, nenhuma das bactérias apresenta capacidade de produção de fosfatase e solubilização de potássio conforme estudo prévio conduzido por Bisognin (2017). No entanto, ambos isolados foram capazes de produzir auxina. Na avaliação da produção de auxinas, ambos os isolados bacterianos produziram elevados níveis do referido hormônio (Figura 1) em comparação com a prova em branco ( $P < 0,05$ ), destacando-se 'XT21' que resultou em níveis três vezes maior que o isolado 'XT23'.



**Figura 1** - Produção de auxina (ug AIA/mL) pelos isolados bacterianos XT21 e XT23 e a prova em branco (testemunha). \*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Com relação à produção de quitinases e proteases, XT21 e XT23 apresentaram capacidade de produção quando utilizada a metodologia descrita. XT21 e XT23 estão envolvidos no biocontrole de *M. graminicola*, sendo provável que um dos mecanismos seja utilizado por esse isolado no controle do fitonematoide, pela ação direta sobre a cutícula dos ovos e dos juvenis de *M. graminicola*. Já para produção de protease, utilizando-se a metodologia que envolve a degradação de Leite Litmus<sup>®</sup>, o isolado XT21 foi o único que proporcionou a produção dessa enzima. O tegumento da casca dos ovos do nematoide das galhas funciona como uma barreira protetora aos embriões e é formada por uma camada vitelínica, mais externa; uma quitinosa, intermediária e constituída por matriz proteica com microfibrilas de quitina; e

uma lipídica, interna (BIRD ; McCLURE, 1976). Nesse sentido, a camada lipídica é responsável por manter a impermeabilidade da casca, enquanto a camada quitinosa fornece proteção à camada lipídica e resistência estrutural; a camada vitelina garante a uniformidade estrutural dos ovos (WHARTON., 1980). Em estudos conduzidos por Dunne e colaboradores (1998), os autores verificaram que a produção de enzimas lipolíticas e quitinolíticas pelas bactérias *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* (M1-12) e *Chromobacterium* sp. inibiram a eclosão de ovos de *Globodera rostochiensis* e, também, diminuíram a viabilidade dos juvenis deste nematoide *in vitro*.

A capacidade de ambos os isolados produzirem sideróforos observada nesse estudo pode estar relacionada à prevenção da proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, uma vez que o tal composto produzido sequestra a maioria do  $Fe^{+3}$  disponível, facilitando o crescimento da planta (BAR-NESS et al., 1992). Adicionalmente, Dunne et al. (1998), relataram que entre os microorganismos da rizosfera, há diversidade de moléculas quelantes de ferro, fato que ressalta a potencialidade do uso de combinações de isolados biocontroladores para promoção do crescimento, e, conseqüentemente supressão de patógenos, quer seja de forma direta sobre o patógeno ou como indutores de resistência. Além disso, o uso de combinações de isolados pode proporcionar a expressão de muitos outros mecanismos com amplo espectro sobre diferentes patógenos (JETIYANON; KLOEPPER, 2002; GUETZKY et al., 2002; BOER et al., 2003).

O uso de rizobactérias visando aumento de produtividade iniciou na década de 50 (KLOEPPER, 1989). Vários estudos relatam a relação de bactérias promotoras de crescimento de plantas com a síntese de fitohormônios e, sabe-se que inúmeras rizobactérias possuem tal habilidade (MELO, 2000). Nesse sentido, a produção de auxinas está relacionada ao desenvolvimento de plantas por ser responsável pela divisão, expansão e diferenciação das células e tecidos das plantas (DORFFING, 1982), cuja fonte de triptofano para sua síntese, por meio de rizobactérias, provém dos exsudatos radiculares do ambiente rizosférico (CACCIARI et al., 1989). Tsavekelova (2005), avaliando o potencial de rizobactérias produtoras de auxinas, dentre elas, *M. luteus*, verificou relação entre a habilidade desses

microorganismos em produzir tal hormônio e estímulo no desenvolvimento de raízes de feijão. Recentemente, Etesami et al., (2014), estudando bactérias isoladas de plantas de trevo, no Irã, quanto a capacidade em produzir compostos relacionados a promoção de crescimento de plantas e biocontrole de fitopatógenos, em plântulas de arroz, relacionaram a alta produção de auxina pelos isolados bacterianos com o aumento significativo no comprimento das raízes. Além disso, os autores sugerem que a capacidade das rizobactérias produzirem auxina confere vantagem competitiva na colonização dos tecidos; o que vem de encontro ao isolado XT23, testado nesse trabalho, considerado uma bactéria endofítica. Colaborando com esta discussão, Sharma e Sharma (2017) afirmaram que a produção de hormônios, enzimas e outros compostos ainda desconhecidos são responsáveis pelo incremento de produção em plantas tratadas com rizobactérias, além de proteger os cultivos contra diversos patógenos.

Por esses motivos é essencial elucidar os mecanismos de ação de microorganismos como XT21 e XT23, uma vez que podem estar atuando por produção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas que agem sobre a cutícula dos ovos e dos J2 (AALTEN et al., 1998), produção de metabólitos tóxicos ao nematóide (SIDDIQUI e SHAUKAT, 2004a) ou outros mecanismos envolvidos na promoção de crescimento (BORONIN et al., 1993) que atuam indiretamente sobre o fitonematoide ou a própria indução de resistência (OSTENDORP e SIKORA, 1990; KLOEPPER et al., 2004).

#### **2.3.4 Prospecção do mecanismo de ação dos isolados selecionados no biocontrole de *M. graminicola* em arroz irrigado BR IRGA 410**

##### **2.3.4.1 Avaliação do potencial de isolados bacterianos selecionados quanto ao efeito nematicida e ovicida sobre *M. graminicola***

De acordo com os dados apresentados na tabela 2, verificou-se pequeno efeito nematicida dos isolados XT23 e XT21 sobre os juvenis de segundo estágio de *M. graminicola* comparativamente com a testemunha ( $P < 0,05$ ). No entanto, observou-se maior atividade ovicida desses mesmos

isolados, reduzindo, em média, 40% da eclosão do J2 em relação a testemunha.

**Tabela 2** - Percentagem da mortalidade e eclosão de J2 de *M. graminicola* pelos isolados bacterianos XT21 e XT23, avaliados em 24h e no 15° dia após o estabelecimento dos tratamentos a 25°C, respectivamente.

Tratamentos bacterianos	Mortalidade (%)	Eclosão (%)	Inibição da eclosão
XT21	20,6a*	45,3b	57,85
XT23	20,4 <sup>a</sup>	47,3b	60,40
Salina	9,7b	78,3a	-
CV (%)	15,1	15,9	

\*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade: Inibição da eclosão em relação à testemunha.

O efeito nematicida destas bactérias pode ser atribuído a produção de compostos capazes de interromper o desenvolvimento do juvenil fora do ovo como a produção de protease, amônia e sideróforos, conforme relatado anteriormente (2.3.3). Já a inibição da eclosão dos juvenis está relacionada, provavelmente, a produção de enzimas líticas que afetam componentes estruturais do ovo como proteínas e quitina (WILLE, 2013).

Resultados semelhantes foram observados por Souza Junior et al (2010), Ludwig et al. (2012) os quais verificaram o potencial nematicida e ovicida de rizobactérias sobre *M. graminicola*. A ação nematicida de bactérias sobre o nematoide das galhas tem sido observada sobre diferentes espécies de *Meloidogyne* e outros gêneros de fitonematoides. Ashoub et al. (2010) relataram mortalidade de até 100% de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* quando em contato com *B. thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens* e *R. leguminosarum*. Da mesma forma, Alves et al. (2011) avaliaram a ação de 20 isolados de bactérias sobre a eclosão e a motilidade de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* e *M. javanica*. Os autores verificaram que nenhum dos isolados avaliados influenciaram a eclosão de *M. incognita*, já para *M. javanica*, os isolados FCAV 8 e FCAV 10 proporcionaram elevada ação ovicida (75,3% e 64,5%, respectivamente) Côrrea et al, observaram, em testes *in vitro*, que a combinação de rizobactérias resultou nas maiores reduções de eclosão e motilidade dos J2 de *M. incognita*.

Análises recentes aumentam os relatos sobre o efeito nematicida de rizobactérias. Xiang et al, (2017) estudaram a ação nociva de isolados

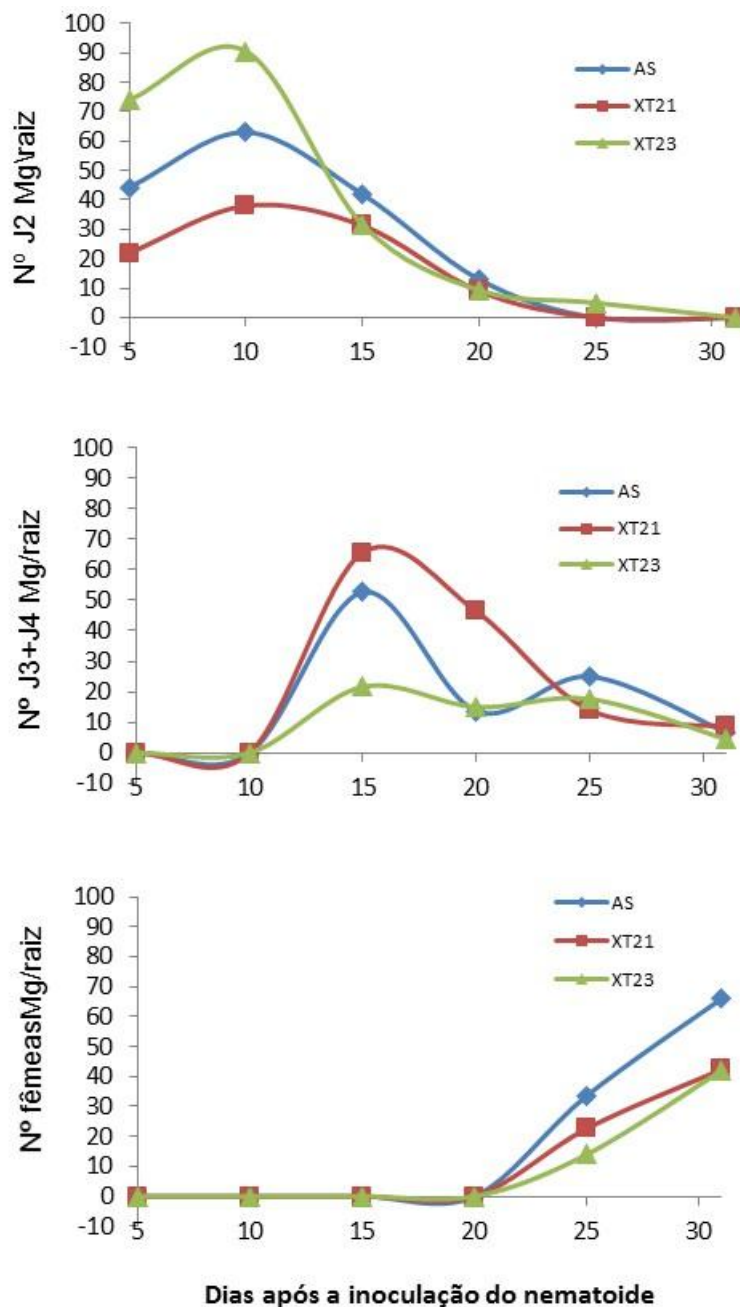
rizobacterianos frente o nematoide do cisto da soja, *H. glycines* em condições de laboratório, em casa de vegetação e a campo. Os resultados mostraram que, *in vitro*, os isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* foram os que promoveram maior mortalidade dos juvenis do nematoide. Em casa de vegetação, os autores relataram que o isolado *B. mojavensis* foi o mais expressivo na redução da densidade do nematoide e *B. safensis* foi responsável pelo controle do nematoide em experimentos à campo. Em trabalho recente, Mota e colaboradores (2017) relataram a ação de isolados bacterianos, oriundos de diferentes espécies vegetais quanto à produção de compostos relacionados ao biocontrole do nematoide anelado, *Mesocriconema xenoplax*. Os autores afirmam que os isolados que produziram ao menos cinco compostos, foram eficientes em controlar o nematoide.

#### **2.3.4.2 Estudo do ciclo biológico de *M. graminicola* em plantas de arroz irrigado provenientes da microbiolização com os isolados bacterianos selecionados**

De acordo com a figura 2, verificou-se que o comportamento do ciclo de vida de *M. graminicola* em plantas de arroz microbiolizadas com as duas bactérias foi variável até o 20º dia após a inoculação, comparativamente a testemunha. Nas plantas de arroz microbiolizadas com XT21, apesar de ser observado menor número de J2 penetrados nas raízes aos 5 DAI, maior número de J3/J4 de *M. graminicola* /sistema radicular foi observado em relação aos demais tratamentos até os 20 DAI. Por outro lado, mesmo tendo sido verificado maior número de J2 nas raízes das plantas de arroz microbiolizadas com XT23 aos 5 DAI, aos 20 DAI os valores foram semelhantes aqueles observados na testemunha. Já aos 25 DAI, verificou-se menor número de J3/J4 e de fêmeas adultas do nematoide nas raízes das plantas de arroz microbiolizadas com ambas as bactérias, que, ao final do período de observação (31 DAI), coincidiu com o menor número de fêmeas adultas nesses mesmos tratamentos bacterianos comparativamente à testemunha.

Embora não tenha sido clara a influência dos tratamentos bacterianos sobre a penetração dos J2 e o desenvolvimento do nematoide até os 20 DAI

nas raízes das plantas de arroz irrigado, há indícios de estar ocorrendo desfavorecimento do desenvolvimento do nematoide nas plantas tratadas com a bactéria, retardando o seu ciclo.



**Figura 2** - Penetração e desenvolvimento de *M. graminicola* (Mg) em plantas de arroz irrigado BR IRGA 410 provenientes da microbiolização com os isolados bacterianos XT21 e XT23 comparativamente a testemunha (sementes tratadas com água salina) por 31 dias em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12h luz.

O mecanismo de ação dos antagonistas avaliados neste estudo parece estar principalmente relacionado à indução de resistência na planta pela produção de algum composto associado à nutrição, desenvolvimento e

reprodução do nematoide, após a sua penetração no hospedeiro. Nesse sentido, Kavino et al. (2007), investigando o papel de rizobactérias *P. fluorescens* na supressão de *M. graminicola* em arroz, especula o papel de enzimas de resistência e outros compostos produzidos em função da defesa induzida nas plantas microbiolizadas com tal bactéria. A influência negativa das rizobactérias no desenvolvimento do nematoide das galhas tem sido também observada em outras culturas e rizobactérias diversas. Almaghrabi, Massoud e Abdelmoneim (2013) tratando plântulas de tomate com a rizobactéria *Serratia marcescens*, verificaram redução no número de juvenis, galhas e massas de ovos de *M. incognita* nas raízes das plantas. Contribuindo com esta discussão, Mohamedova e colaboradores (2016), estudaram o efeito de duas rizobactérias, *Pantoea agglomerans* e *Bacillus subtilis* sobre o nematoide das galhas *M. javanica* em plantas de berinjela. Os autores relatam que ocorreu retardo na penetração de juvenis nas plantas após tratamento de sementes com as bactérias, além de incremento de produção

### **2.3.5 Potencial dos isolados bacterianos selecionados no biocontrole de *M. graminicola*, promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado e influência no conteúdo de enzimas relacionado à resistência a doenças**

A condução de experimento em rizotron com os isolados XT21 e XT23 confirmaram seus potenciais como biocontroladores de *M. graminicola*; assim como também, sua capacidade como promotores de o crescimento das plantas de arroz comparativamente a testemunha (Tabela 3 e Figuras 5).

A microbiolização das sementes de arroz com ambos isolados resultou em redução significativa do número de galhas das raízes ( $P < 0,05$ ) e no biocontrole do nematoide, suprimindo a reprodução do patógeno em valores percentuais de 71,9 e 68,5% conforme valores de número de ovos e FR de *M. graminicola* apresentados na tabela 3.

Da mesma forma, os tratamentos bacterianos das plantas com XT23 proporcionaram incrementos de mais de duas e cinco vezes no peso massa fresca da parte aérea e das raízes das plantas de arroz em relação a testemunha, respectivamente. Embora o isolado XT21 não tenha promovido o



crescimento de plantas no experimento anterior (item 2.3.2), nas condições desse bioensaio, proporcionou ganhos semelhantes ao isolado XT23 para aumento do peso de ambas variáveis associadas ao desenvolvimento vegetativo do arroz, conforme pode ser observado na tabela 3 e na figura 3.

**Tabela 3** - Biocontrole de *Meloidogyne graminicola* e promoção do crescimento de plantas de arroz BR IRGA 410 oriundas de sementes microbiolizadas com os isolados bacterianos XT21 e XT23.

Tratamentos	Parte Aérea (g)	Raízes (g)	N° Galhas	N° Ovos	FR
Testemunha	28,9*a	14,1a	85,7a	162.033,3a	54,0a
XT21	75,4b	94,6b	52,7b	45.533,3b	15,2b
XT23	67,8b	72,0c	51,0b	50.983,3b	17,0b
CV (%)	18,1	27,3	22,4	20,0	22,1

Testemunha - Plantas de arroz cujas sementes foram tratadas com solução salina. \*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.



**Figura 3** - Parte aérea e sistema radicular de plantas de arroz irrigado BR IRGA 410 oriundas de sementes microbiolizadas com os isolados bacterianos XT21 e XT23, comparados a testemunha tratada com solução salina.

Além disso, após análise da atividade enzimática nas plantas microbiolizadas e inoculadas com *M. graminicola*, verificou-se alteração significativa no conteúdo de PO e PF, não havendo efeito dos tratamentos sobre os níveis de fenilalanina amônia-liase nos tecidos das plantas de arroz analisadas (Tabela 4). De acordo com a tabela 4, naquelas plantas microbiolizadas com o isolado XT23, houve redução significativa de até três

vezes na atividade enzimática de PO tanto no tecido foliar como nas raízes; e, redução na atividade de PFO em mais de duas vezes comparativamente a testemunha. Já para o isolado XT21 o efeito significativo foi apenas para a enzima PO nos tecidos das raízes. Nesse sentido, ficou bastante evidenciada a ocorrência de alterações na atividade de PO e PFO nas plantas de arroz microbiolizadas com os isolados rizobacterianos, indicando possível indução de resistência.

**Tabela 4** - Atividade enzimática de peroxidase, polifenol-oxidase e fenilalanina em folhas e raízes das plantas de arroz BR IRGA 410 previamente microbiolizadas com os isolados rizobacterianos XT21 e X23 e inoculadas com *M. graminicola* em comparação com a testemunha (tratamento das sementes com solução salina).

Tratamentos Bacterianos	Atividade enzimática (UE.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de tecido)					
	Peroxidase		Polifenol-oxidase		Fenilalanina amônia-liase	
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Testemunha	1598,5a	698,5a	414,1a	151,1a	21,7a	2,6a
XT21	1011,4ab	378,5b	307,4ab	139,2a	23,3a	3,6a
XT23	479,2b	297,2b	288,1b	133,3a	23,7a	2,7a
CV (%)	18,2	15,7	11,2	17,0	23,8	19,7

\*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Em trabalho anterior, Sousa Júnior e colaboradores (2010) estudando o efeito de rizobactérias sobre *M. graminicola* na cultivar de arroz El Paso L144, verificaram que, após a microbiolização de sementes, todos os tratamentos apresentaram redução no número de galhas (30 a 70% em relação a testemunha) e quatorze isolados reduziram o fator de reprodução do nematoide (31 a 62%). Com relação a promoção de crescimento dez tratamentos proporcionaram incremento médio de 18%. Em trabalho conduzido a campo por Seenivasan (2010), em área naturalmente infestada por *M. graminicola*, o autor verificou que a microbiolização de sementes de arroz com *Pseudomonas fluorescens* e o fungo *Purpureocillium lilacinus* (Thom) Luangsa-ard et al. ou sua aplicação no solo além de ter proporcionado controle do nematoide, o tratamento bacteriano resultou em aumento significativo na produção de grãos.

Conforme citado anteriormente, efeitos de rizobactérias na promoção de crescimento e biocontrole do nematoide das galhas tem sido relatado na cultura do arroz assim como em outras espécies vegetais como destaca Freitas (2007) que, testando o efeito de *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas putida*

sobre *Meloidogyne javanica* em plantas de tomate e em diferentes tipos de solo observou que as bactérias reduziram o número de galhas em 41,5 e 35,3%, em solo de barranco (*C. freundii* e *P. putida*, respectivamente). Colaborando com estes resultados, Ravari e Moghaddam (2015) demonstraram que, tratando sementes de tomate com dois isolados de *Bacillus thuringiensis*, ocorre redução do número de galhas, em 51%, além de promover maior crescimento nas plantas de tomate testadas, em casa de vegetação. Boukerma (2017) estudando o potencial de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* no controle de doenças em tomate verificou que as rizobactérias ocasionaram um atraso no aparecimento de sintomas ocasionados por murcha de rizoctonia, além de redução nos níveis de infecção (7 a 37%) e severidade da doença (37-72%).

Girio et al. (2015) avaliando o efeito de bactérias promotoras de crescimento sobre a formação de mudas de cana-de-açúcar, observaram que os tratamentos inoculados com bactérias apresentaram aumento na velocidade de brotação comparativamente aos demais tratamentos. Isto ocorreu, provavelmente, devido a capacidade de algumas bactérias em sintetizar diferentes fitorreguladores de crescimento favorecendo maiores brotações.

Considerando os resultados *in vitro* quanto a atividade nematicida e ovicida sobre *M. graminicola*, parece evidente que tanto o isolado XT21 quanto XT23 estão muito mais relacionados com indução de resistência na planta do que a um efeito direto no controle do nematoide. Nesse sentido, especula-se a redução dos níveis de PO e PFO nas plantas de arroz microbiolizadas com tais bactérias tenha ativado algum mecanismo de resistência, e, assim, permitindo que a mesma gastasse menos energia para se defender, conforme redução significativa da atividade das duas enzimas verificada no presente estudo. Steffen et al. (2008) avaliando a influência da pulverização foliar de plantas de arroz e do tratamento do solo com os óleos essenciais de alfazema e cidrão, também associaram indução de resistência na planta a *M. graminicola* reduzindo em 72% e 74% o número de ovos do nematoide, com óleo de alfazema e cidrão, respectivamente. No entanto, em outro estudo, Seenivasan et al. (2010) relacionaram o biocontrole de *M. graminicola* ao aumento do conteúdo de fenol, peroxidase e quitinase em plantas de arroz tratadas com

*Pseudomonas fluorescens*. Os autores também observaram que ocorreu aumento na produção de grãos das plantas tratadas, que variou de 20,6% a 26,9%, além de incrementos nos parâmetros vegetativos de desenvolvimento de plantas, como altura das plantas, peso e comprimento das raízes e número de perfilhos.

### **2.3.6 Avaliação do potencial de colonização radicular *in vitro* de sementes de diferentes cultivares de arroz irrigado pelos isolados bacterianos selecionados**

Avaliando-se as cultivares de arroz irrigado e pré-germinado quanto a colonização radicular por rizobactérias selecionadas (XT21 e XT23), verificou-se que ambos isolados colonizaram as raízes das plântulas de arroz, porém com variações na intensidade de colonização (Tabelas 5 e 6).

A partir dos resultados da tabela 5, verificou-se que dez das 16 cultivares de arroz avaliadas foram colonizadas pelas duas bactérias. Analisando-se os índices de colonização radicular dentro de cada isolado, para 'XT21', a cultivar Querência obteve nota máxima de colonização (Figura 4), no entanto tal índice de colonização não diferiu estatisticamente de outras sete cultivares de arroz convencional testadas (Taim, CNA 10756, BR IRGA 410, BRA 050099, Bojuru, BRA 01455 e CNA 10757). Apenas as raízes da cultivar 'BRA 030008' não foram colonizadas pelo isolado XT21; e as cvs. BRA 050099, Pelota, Chuí e CNA 10757 não diferiram da testemunha ( $P > 0,05$ ). Em relação ao isolado XT23, observou-se que todas as cultivares foram colonizadas pela bactéria, porém, 'Fronteira' e 'BRA 050099' não diferiram significativamente da testemunha tratada com água salina.

**Tabela 5** - Colonização de sementes de 16 cultivares de arroz irrigado para o sistema convencional microbiolizadas com os isolados bacterianos XT21 e XT23 em comparação com o controle cujas sementes foram tradas com solução salina.

<b>Genótipo</b>	<b>Isolado XT21</b>	<b>Isolado XT23</b>	<b>Controle</b>	<b>CV (%)</b>
BRS Querência	3,0 <sup>1</sup> A*a	2,3 <sup>1</sup> Aab	1,3 <sup>1</sup> b**	12,01
Taim	2,5Aa	2,0Aa	0,0b	9,05
CNA 10756	2,3Aa	2,3Aa	0,0b	6,84
BR IRGA 410	2,1Aa	2,8Aa	0,3b	9,15
BRA 050099	2,0Aa	1,5Bab	0,0b	15,25
Bojuru	2,0Aa	2,3Aa	0,0b	12,2
BRA 01455	1,8Aa	2,6Aa	0,0b	7,45
CNA 10757	1,8Aab	2,8Aa	0,5b	11,01
Chui	1,5Bab	1,6Ba	0,0b	6,55
Atalanta	1,5Ba	2,0 Aa	0,0 b	9,06
Firmeza	1,3Ba	0,8Ba	0,0b	8,31
Fronteira	1,2Ba	1,8Ba	1,0a	10,36
BRA 040081	1,0Ba	1,3Ba	0,0b	9,22
Pelota	0,8 Bb	2,0Aa	0,8b	12,67
Ligeirinho	0,3Ca	1,3Ba	0,0a	15,05
BRA 030008	0,0Cb	2,1Aa	0,0b	18,32
<b>CV (%)</b>	<b>35,22</b>	<b>28,95</b>		

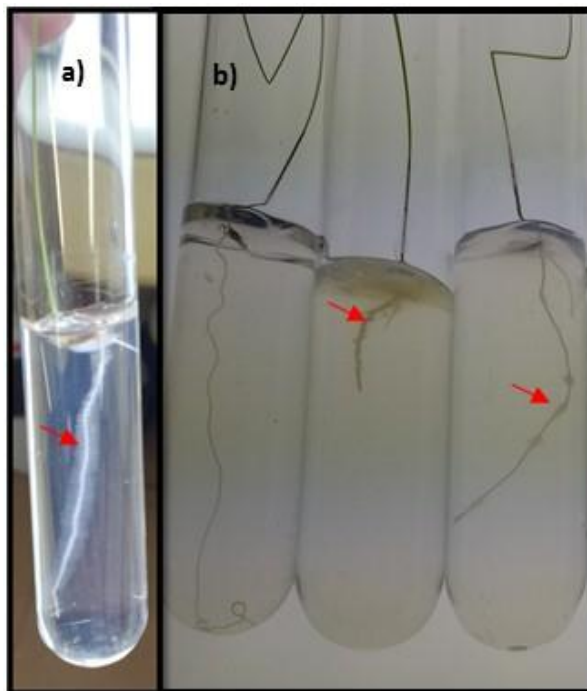
<sup>1</sup>Escala de notas de Habe e Uesugi (2000); \*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (entre cultivares para cada bactéria), na coluna, não diferem entre si pelo Teste de agrupamento de Scott & Knott a 5%; e, \*\*Médias seguidas e pela mesma letra minúscula (entre bactéria em cada cultivar) na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan a 5%.

Analisando-se a tabela 6, observa-se que os dois isolados bacterianos selecionados foram capazes de colonizar o sistema radicular das plântulas de arroz pré-germinado de todas as cultivares avaliadas, embora estatisticamente tal variável não tenha sido significativa para a interação 'XT21' e 'EPAGRI 109'. O isolado XT23 foi destaque com alta intensidade de colonização em todas as cultivares testadas, entretanto, para o tratamento com a rizobactéria XT21, as cvs. EPAGRI112 e 114 apresentaram índices de colonização radicular mais intensos comparativamente à 'SSC109' (Figura 4).

**Tabela 6** - Colonização de sementes de três cultivares de arroz irrigado para o sistema pré-germinado microbiolizadas com os isolados bacterianos XT21 e XT23 em comparação com o controle cujas sementes foram tradas com solução salina.

<b>Isolados</b>	<b>Cultivares</b>			
	<b>Bacterianos</b>	<b>SSC109</b>	<b>EPAGRI112</b>	<b>EPAGRI114</b>
XT21		1,40Bb*	2,18Aa	2,66Aa
XT23		2,80Aa	2,50Aa	2,80Aa
Testemunha		0,90Ba	0,0Bb	0,00Bb
CV%		40,66	21,30	23,74

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e, pela letra minúscula, na linha, não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.



**Figura 4** - Colonização de raízes de arroz irrigado para sistema convencional cv. BRS Querência pelo isolado bacteriano XT21 (a); e, colonização radicular de cultivares de arroz pré-germinado, da esquerda para a direita: Testemunha (Solução salina) e cultivares EPAGRI 109 e EPAGRI 112 com o isolado bacteriano XT21 (b).

Habe e Uesugi (2000) afirmam que é essencial um método fácil e eficiente para seleção de rizobactérias colonizadoras de raízes, sendo requisito para avançar nos processos de controle biológico de fitopatógenos. Além disto, identificar a capacidade de rizobactérias na colonização do sistema radicular através da microbiolização de sementes é um excelente e fácil método para selecionar bactérias (SOTTERO, 2006).

Neste trabalho verificou-se interação positiva entre a colonização das raízes de arroz e efeito antagonista das bactérias sobre *M. graminicola* e benefício as plantas tratadas. Porém isto nem sempre é observado. Mota (2012) relata em trabalho realizado com bactérias isoladas de diferentes espécies vegetais, que alguns isolados não colonizaram o sistema radicular de pessegueiro, mas foram promissores no controle de *Mesocriconea xenoplax*, reduzindo em mais de 50% o fator de reprodução do nematoide, demonstrando

que rizobactérias também podem atuar no controle do nematoide através de mecanismos diretos (LOPES, 2011).

A relação entre a colonização de raízes e o bicontrol e promoção de crescimento de plantas é tal que permite saber informações sobre o comportamento de rizobactérias quanto a habilidade de colonização. Como o meio utilizado é pobre em carbono, as bactérias que se desenvolvem são aquelas que metabolizam exsudatos radiculares possuindo afinidade pelas raízes, principalmente no que se refere a sua habilidade de sobrevivência utilizando apenas os exsudatos das raízes das plantas (QUEIROZ; VILDOSO; MELO, 2006).

O crescente aumento da população mundial chama a atenção para a necessidade de novas alternativas para, além de alimentar, também, vestir e transportar milhares de pessoas. É necessário a efetivação de novas tecnologias sustentáveis e, o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas é uma alternativa inovadora para aumentar a produção agrícola sem agressão ao ambiente. Neste trabalho, rizobactérias isoladas do xisto demonstraram potencial para aumentar a produção de arroz irrigado e controlar um dos principais patógenos da cultura, o nematoide *M. graminicola*. Além da bioprospecção dos novos isolados, é iminente estudos com formulações e sobrevivência do antagonista em condições de campo, além de trabalhos para conhecer a melhor forma de aplicação do microorganismo e a viabilidade econômica da adoção desta prática. O uso de rizobactérias para incrementar a produção agrícola e auxiliar no controle de fitopatógenos é uma realidade, mas os estudos devem ser constantes visando maior eficiência.

## 2.4 Conclusão

- Existem rizobactérias isoladas de folhelhos pirobetuminosos potenciais para o biocontrole do nematoide das galhas *M. graminicola* e promoção de crescimento em plantas de arroz irrigado;

- Os isolados bacterianos selecionados (XT21 e XT23) produzem compostos relacionados ao biocontrole e a promoção de crescimento;

- Embora as rizobactérias XT21 e XT23 apresentem atividade ovicida e nematicida sobre *M. graminicola*, o principal mecanismo de ação no biocontrole está relacionado a indução de resistência demonstrando seus potenciais para o biocontrole e promoção de crescimento de plantas de diferentes cultivares de arroz irrigado.



### **3 CAPÍTULO II – Agressividade de populações de *Meloidogyne graminicola* em cultivares de arroz irrigado, controle biológico do nematoide das galhas e promoção de crescimento pelo uso de rizobactérias**

#### **3.1 Introdução**

O Brasil é destaque na produção mundial de arroz, um dos cereais mais importantes e cultivados no país, tendo seu consumo difundido em todas as classes sociais. (IRGA, 2014). Mundialmente, o arroz é o segundo cereal mais cultivado, ocupando área de aproximadamente 162 milhões de hectares, e, produção de 748 milhões de ton. (FAOSTAT, 2014). Possui importância socioeconômica, principalmente na Ásia, África e América Latina. O Brasil é o décimo maior produtor mundial de arroz, com produção superior a 11 milhões de ton. (CONAB, 2017).

Na América do Sul o Brasil é o principal produtor, participando com cerca de 79,3% da produção do Mercosul, seguido pelo Uruguai, Argentina e Paraguai (CONAB, 2017). No Brasil, a maior produção vem da região Sul do país, tendo como principal produtor o estado do Rio Grande do Sul com área de 1.120,085 de ha e produtividade média de 7.700 Kg/ha (IBGE 2017). O estado de Santa Catarina é o segundo maior produtor nacional, atingindo produção de 1. 102, 206 ton. e, produtividade de 7.338 Kg/ha em área de 148,134 ha em sistema pré-germinado (IBGE, 2017).

Frequentemente os agricultores enfrentam problemas fitossanitários que ocasionam as principais perdas na cultura do arroz, sendo associadas a doenças e pragas. Em torno de 29 espécies de fitonematoides podem estar associadas ao arroz irrigado, causando ao redor do mundo, perdas de 10 a 25% nas lavouras (BRIDGE; PLOWRIGHT; PENG, 2005). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são considerados os de maior importância econômica na agricultura e os que causam os maiores danos no cultivo do arroz (KYNDT,

2014). Entre as espécies de nematoide das galhas, *Meloidogyne graminicola* Golden e Birchfield, 1965, é a que causa maiores prejuízos nas lavouras arrozeiras (PADGHAM, 2004). No Rio Grande do Sul este fitoparasita foi relatado pela primeira vez por Sperandio e Monteiro em 1991 na cultura do arroz. Negretti et al. (2017) verificaram que *M. graminicola* é a espécie predominante em lavouras arrozeiras do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. No entanto os autores observaram a presença de três populações atípicas de *Meloidogyne* sp. em lavouras de arroz irrigado no Sul do Brasil, onde uma delas, presente em Santa Catarina, foi previamente caracterizada como *M. oryzae* Maas, Sanders & Dede, 1978, uma espécie exótica em nossas condições.

O ciclo de vida de *Meloidogyne* inicia com a penetração do juvenil no interior das raízes. Uma vez que ocorre a penetração o mesmo induz a formação de engrossamentos anormais nas raízes das plantas, provocados pelo aumento das células no entorno de seu sítio de alimentação (hipertrofia) com a posterior multiplicação exagerada das células formando os tumores (galhas) à volta do tecido parasitado (GOMES, 2013). A partir de então, ocorre um dreno de nutrientes para esses sítios de alimentação, provocando o enfraquecimento das plantas parasitadas. Em arroz irrigado a penetração do juvenil (J2) ocorre antes da entrada da lâmina de água na lavoura, a partir daí o nematoide se reproduz e forma o sítio de alimentação sem sofrer danos pela falta de oxigênio ocasionado pela inundação da área (SORIANO et al., 2003).

Os principais sintomas que plantas de arroz apresentam devido ao ataque de *M. graminicola* são retardamento do crescimento e redução do número de perfilhos. As folhas tornam-se, muitas vezes, murchas e amareladas, consequência da dificuldade da planta em absorver água e nutrientes através da raiz. O principal dano ocorre no sistema radicular das plantas que adquire aspecto de cabo de guarda-chuva nas pontas, os quais são engrossamentos popularmente conhecidos como galhas (GOMES et al., 1997; STEFEN et al., 1997).

O fato de não existir cultivares de arroz resistentes a *M. graminicola* e a inexistência de produtos químicos registrados para a cultura no MAPA (Agrofit, 2017), torna difícil o controle deste patógeno. Nesse sentido, estratégias de

manejo do nematoide das galhas em áreas afetadas utilizando-se do controle biológico, apresenta como aspectos positivos o baixo custo econômico e ambiental.

Rizobactérias são encontradas na rizosfera e/ou rizoplane de plantas e podem promover o crescimento de plantas e, também, agir contra fitopatógenos (KLOPPER et al., 1990), onde o uso destes microorganismos consiste em ativar mecanismos de defesa da planta ou parte desta (AGRIOS, 2005). Nesse sentido, rizobactérias têm sido usadas com sucesso em várias interações planta x nematoides com resultados benéficos no controle de doenças e no incremento ao desenvolvimento de plantas (FABRY et al., 2007; ALMAGHRADI et al., 2013). Estes organismos podem atuar em benefício a diversos cultivos de forma indireta na supressão de doenças de plantas, e, diretamente, pela produção de fitohormônios, fixação de Nitrogênio dentre outros compostos ainda desconhecidos (ALMAGHRABI et al., 2012; SHARMA; E SHARMA (2017). Ludwig et al. (2013) verificaram que rizobactérias eficientes no controle de doenças foliares do arroz foram também promissoras no controle de *M. graminicola*, em condições de casa de vegetação. Dentre os isolados testados, os autores destacaram *Pseudomonas synxatha* e *P. fluorescens* como efetivas na redução do número de galhas e no fator de reprodução do nematoide. Em trabalho realizado por Neves et al. (2000), isolados bacterianos com efeitos de indução de resistência sobre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foram testados contra *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* em plantas de tomate. Os autores encontraram resultados promissores com reduções de 77,4% no número de ovos e 66,4% no número de galhas, comparativamente a testemunha não tratada com bactérias.

O arroz é uma cultura de importância socioeconômica para o Brasil, e *M.graminicola* é uma ameaça por ser estar largamente distribuído e ser de difícil controle. Além do mais, pouco se sabe sobre a agressividade de populações dessa espécie em diferentes cultivares de arroz, assim como também existem poucos relatos sobre o potencial de rizobactérias no controle de *M. graminicola* e na promoção de crescimento da cultura. Dessa forma, foram objetivos desse estudo: a) estudar a agressividade de diferentes

populações de *M. graminicola* em cultivares comerciais de arroz irrigado; b) avaliar o potencial de rizobactérias como agentes para o controle biológico do nematoide das galhas, em arroz irrigado, em condições de casa de vegetação; e, c) avaliar o potencial destes organismos na promoção de crescimento de plantas de arroz irrigado e produção, em condições de campo.

### **3.2 Material e Métodos**

#### **3.2.1 Agressividade de populações de *Meloidogyne graminicola* em diferentes cultivares de arroz irrigado**

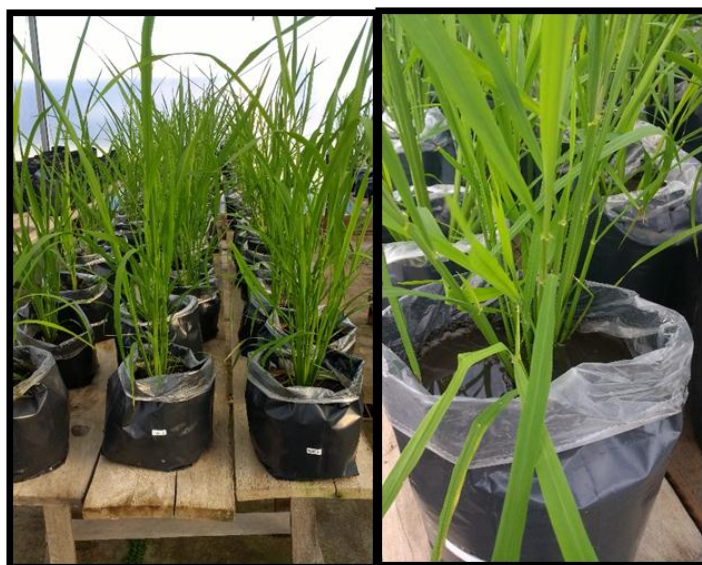
O presente estudo foi conduzido nas casas de vegetação e laboratório de fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas. Avaliou-se a agressividade de três populações puras de *M. graminicola* Est VS1 (população P1- Santa Maria-RS; população P2 - Capão do Leão-RS e população P3 – Camboriú-SC) em duas cultivares comerciais de arroz irrigado convencional (BRS Querência e BR IRGA 410) provenientes da Embrapa Clima Temperado e três cultivares de arroz pré-germinado (EPAGRI 109, SCS 112 e SCSBRS 114), provenientes da Empresa de Pesquisa e Extensão de Santa Catarina (Epagri).

As diferentes populações de *M. graminicola* foram multiplicadas em plantas de arroz cultivar BR-IRGA 410, mantidas em vasos com solo esterilizado, em casa de vegetação à 25°C (Figura 5), sendo a pureza de cada uma delas verificada pela técnica da eletroforese utilizando-se a isoenzima esterase (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001). Para obtenção do inoculo, raízes de arroz infectadas com cada uma das populações de *M. graminicola*, foram processadas separadamente conforme metodologia de Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981). A seguir, plantas individuais de cada cultivar de arroz com aproximadamente uma semana e mantidas em vasos com solo esterilizado, foram inoculadas com uma suspensão contendo 5000 ovos e juvenis de 2º estágio (J2) de *M. graminicola* (população inicial) de cada uma das populações do nematoide, separadamente. Plantas de arroz das mesmas cultivares, não inoculadas com o nematoide-das-galhas, foram

utilizadas para avaliação do impacto do nematoide sobre o desenvolvimento vegetativo. Decorridos cinco dias da inoculação, manteve-se uma lâmina d'água de 2,0 cm acima da superfície do solo de cada vaso até o final do experimento.

Aos 90 dias após a inoculação, a parte aérea das plantas, nos diferentes tratamentos, foi avaliada quanto a massa fresca e número de perfilhos. Posteriormente, as raízes de cada planta foram lavadas e avaliadas quanto a massa fresca e número de galhas. A seguir, procedeu-se a extração de ovos e J2 das raízes de cada planta pela técnica de Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981) para quantificação da população final e posterior determinação do fator de reprodução ( $FR = \text{população final/população inicial}$ ) de cada uma das populações de *M. graminicola*, conforme Oostenbrink (1966).

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 4 x 5 (3 populações de *M. graminicola* e testemunha sem nematoide e 5 cultivares de arroz irrigado) em delineamento completamente casualizado com seis repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental representada por uma planta. Os valores das variáveis, obtidas nos respectivos tratamentos, foram submetidos a ANOVA, sendo as médias dos tratamentos 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).



**Figura 5** - Plantas de arroz inoculadas com *M. graminicola*, e mantidas sob condições de alagamento, em casa de vegetação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

### 3.2.2 Controle Biológico de *M. graminicola* pelo uso de rizobactérias

Para avaliar o potencial de rizobactérias no controle do nematoide das galhas, *M. graminicola*, em arroz irrigado, dois isolados bacterianos provenientes da coleção de microorganismos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, (XT21 - *Arthorbacter pascens* - Lochhead and Burton, 1953 e XT23 - *Micrococcus luteus* – Schroeter, 1872) provenientes de rochas sedimentares marinhas e previamente selecionados (capítulo 1) foram utilizados nesse estudo.

Para condução do bioensaios, utilizaram-se as cultivares de arroz irrigado para sistema o convencional (BRS Querência) e pré-germinado (SCS 112) mais suscetíveis; e, como inóculo do nematoide, foi utilizada a população mais agressiva de *M. graminicola* (Capão do Leão-RS).

O ensaio foi conduzido, em casa de vegetação a 25°C, em esquema fatorial 2X3 para os fatores, cultivar e isolado bacteriano (duas bactérias e a testemunha sem bactéria) com delineamento inteiramente ao acaso e seis repetições por tratamento. Primeiramente, as sementes de arroz de ambas cultivares selecionadas foram microbiolizadas com a suspensão bacteriana dos isolados bacterianos XT21 e XT23. Para tanto, ambos os isolados, mantidos em cultura pura, foram repicados para meio 523 (KADO Heskett,1970) e incubados por 24-48h à 25°C. Logo após, as células bacterianas crescidas foram transferidas para solução salina estéril (0,85%) e, da suspensão obtida, realizou-se o ajuste de concentração para ( $A_{540}=0,5$ ) em espectrofotômetro. A seguir, as sementes foram secas em fluxo laminar e imediatamente semeadas em vasos de 3 kg, contendo solo esterilizado. Dez dias após a semeadura, foi feito o desbaste deixando-se uma planta por vaso; e, a seguir, procedeu-se a inoculação utilizando-se 5000 ovos + juvenis de segundo estágio (J2) de *M. graminicola*/planta nos diferentes tratamentos. Plantas de arroz das mesmas cultivares, inoculadas com o nematoide e não microbiolizadas, foram utilizadas como testemunhas.

Decorridos 60 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas quanto ao peso da matéria fresca da parte aérea e da raiz e número de galhas por sistema radicular. A seguir, procedeu-se a extração de ovos e J2 das raízes

conforme método de Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981) para determinação da população final e cálculo do fator de reprodução do nematoide (OOSTEMBRINK, 1966). A seguir, os valores das diferentes variáveis, obtidos em cada repetição, foram submetidos à análise de variância, sendo as médias de cada tratamento, em esquema fatorial, comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

### **3.2.3 Eficiência de rizobactérias no desenvolvimento de plantas e produção de sementes de arroz irrigado**

O experimento foi instalado na área experimental na Estação Experimental Terras Baixas, Embrapa Clima Temperado, Capão do Leão, RS, cujo solo é classificado como Planossolo Háplico distrófico típico. O delineamento experimental utilizado foi de cultivo em faixas (2,5 x10 m) com 6 tratamentos e 4 repetições. As parcelas experimentais receberam adubação conforme a dose recomendada de 1 t ha<sup>-1</sup> em ROLAS (2004), sendo aplicado 350 kg ha<sup>-1</sup> da fórmula 2-20-20. A adubação nitrogenada consistiu de 90 N (Ureia) kg ha<sup>-1</sup> parcelada em duas doses: 50% no início do perfilhamento e 50% no pleno florescimento.

A semeadura se deu em cada faixa com a cultivar de arroz irrigado BRS Querência, conforme os seguintes tratamentos:

- Faixa A: T1 - solo natural, sem aplicação de finos de xisto (FX) + sementes de arroz não microbiolizadas (testemunha);
- Faixa B: T2 - aplicação anual de 3 t ha<sup>-1</sup> de FX 100% <0,3 mm e sementes de arroz não microbiolizadas;
- Faixa C: T3 - sem aplicação de FX e sementes de arroz microbiolizadas com o isolado bacteriano XT21;
- Faixa D: T4 - aplicação anual de 3 t ha<sup>-1</sup> de FX 100% <0,3 mm e sementes de arroz microbiolizadas com XT21;
- Faixa E: T5 - sem aplicação de FX e sementes de arroz microbiolizadas com o isolado bacteriano XT23;
- Faixa F: T6 - aplicação anual de 3 t ha<sup>-1</sup> de FX 100% <0,3 mm e sementes arroz microbiolizadas com XT23.

As sementes de arroz foram microbiolizadas com suspensões bacterianas ajustadas em espectrofotômetro ( $A_{540}=0,5$ ) e então semeadas utilizando-se  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  como densidade de semeadura. Decorridos 100 dias da semeadura, avaliou-se a resposta agrônômica dos tratamentos, colhendo-se 20 plantas na área útil da parcela ( $1,5 \times 1,0 \text{ m}$ ), considerando-se cada uma como unidade experimental. Foram analisadas as seguintes variáveis: diâmetro do colo, altura de planta, massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz e peso de grãos por planta. A seguir, os valores das diferentes variáveis, obtidas nos diferentes tratamentos, foram submetidos à análise da variância, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5%.

### **3.3 Resultados e Discussão**

#### **3.3.1 Agressividade de populações de *Meloidogyne graminicola* a diferentes cultivares de arroz irrigado**

De acordo com os resultados observados neste estudo, verificou-se interação significativa entre as cultivares de arroz e populações de *M. graminicola* para as variáveis relacionadas a reprodução e danos causados pelo nematoide, além daquelas associadas ao desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular das plantas de arroz (Tabelas 7 e 8). Apenas para número de perfilhos/planta não houve interação entre os fatores, os quais mesmo analisados isoladamente, não foram significativos ( $P < 0,05$ ), conforme apêndice A.

Com relação ao número de galhas nas raízes (Tabela 7), observou-se maior número em todas as cultivares de arroz infectadas com as populações P1 e P2 de *M. graminicola*, observando-se maior severidade dos danos nas cultivares BRS Querência e BR IRGA 410. Analisando o efeito da população P3 sobre o número de galhas das raízes, os maiores danos foram observados na cv. BR IRGA 410 porém os resultados não diferiram das cvs. de arroz pré-germinado.



**Tabela 7-** Número de galhas e fator de reprodução de *M. graminicola* em cinco cultivares comerciais de arroz irrigado e pré-germinado infectadas com três populações de *M. graminicola*. População P1 (Santa Maria, RS), população P2 (Capão do Leão, RS) e população P3 (Balneário Camboriú, SC). Pelotas, RS.

<i>M. graminicola</i> populações	Cultivares/Nº Galhas					
	EPAGRI109 <sup>pg</sup>	SCS112 <sup>pg</sup>	SCSBRS114 <sup>pg</sup>	Querência <sup>c</sup>	BRIRga410 <sup>c</sup>	CV (%)
P1	189,66Ba	195,67Bab	170,40Bb	278,50Aa	276,40Aa	12,00
P2	201,66Ba	211,67Ba	216,83Ba	268,83Aa	274,83Aa	5,61
P3	161,33ABb	160,50ABb	164,17ABb	152,83Bb	192,60Ab	17,15
CV (%)	9,17	16,03	9,76	13,05	6,49	

<i>M. graminicola</i> populações	Cultivares/FR					
	EPAGRI109	SCS112	SCSBRS114	Querência	BRIRga410	CV (%)
P1	8,09Cb	10,83Ba	8,26Ca	15,69Aa	11,13Bb	18,21
P2	11,26Ba	11,64Ba	9,02Ca	16,35Aa	16,15Aa	9,00
P3	5,36Abc	5,15Bb	6,75Ab	5,36ABb	5,61Abc	19,23
CV (%)	19,44	18,53	10,93	10,93	6,56	

\* Médias seguidas por letras iguais e maiúsculas, na mesma linha, e, minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação; FR= fator de reprodução do nematoide; pg- cultivo pré-germinado; c- cultivo convencional.

Da mesma forma, as populações P1 e P2 foram também as que mais se reproduziram nas diferentes cultivares de arroz avaliadas, sobretudo P2, conforme valores de FR apresentados na tabela 7. Avaliando-se a reprodução de *M. graminicola* nos genótipos testados, de um modo geral, verificaram-se maiores valores de FR na cv. Querência independentemente da população do nematoide. No entanto, plantas das cvs. BR IRGA 410 e SCSBRS 114 inoculadas com a população P3; e a primeira inoculada com P2 também resultaram em maiores valores de FR do nematoide.

Analisando-se a interferência do nematoide-das-galhas sobre o desenvolvimento das plantas de arroz, para a variável massa fresca das raízes, observou-se interferência do patógeno sobre as cultivares SCSBRS 114, Querência e BR IRGA 410 em relação às respectivas testemunhas não inoculadas, havendo maior redução de peso na primeira com as populações P2 e P3, e, nas duas cultivares convencionais, sobretudo com a população P3. Já para a massa fresca da parte aérea, verificou-se redução significativa dessa variável em todas as cultivares inoculadas com as populações P1 e P3; e, exceto em SCSBRS 114, para as demais cultivares de arroz de cultivo

convencional e pré-germinado inoculadas com a população P2 (Tabela 8; Figura 6).

Quando avaliado a massa fresca das raízes de arroz, dentro de cada população de *M. graminicola*, maior impacto negativo da População P1 ocorreu sobre as duas cultivares de arroz convencional; a população P2 sobre SCSBRS114 e Querência; e a população P3 em ambas cultivares de sistema convencional e em SCSBRS114. Por outro lado, todas populações do nematoide testadas apresentaram menor impacto sobre a massa fresca raízes da cv. SCS 112; e, P2 e P3 sobre EPAGRI 109.

**Tabela 8-** Massa fresca da raiz e da parte aérea em plantas de arroz infectadas com três populações de *M. graminicola*. População P1 (Santa Maria, RS), população P2 (Capão do Leão, RS) e população P3 (Balneário Camboriú, SC). Pelotas, RS.

<i>M. graminicola</i> populações	Cultivares/MFR (g)					
	EPAGRI109 <sup>pg</sup>	SCS112 <sup>pg</sup>	SCSBRS114 <sup>pg</sup>	Querência <sup>c</sup>	BRIRga410 <sup>c</sup>	CV (%)
P1	107,67Ba	115,03Aa	105,3Bab	81,3Cab	81,32Cbc	16,06
P2	114,99Aa	105,63ABb	87,11Bb	95,17ABa	92,53ABab	18,28
P3	112,26Aa	103,24ABb	88,30BCb	75,59Cb	77,28Cc	15,67
Testemunha	109,05Aa	111,67Aab	118,36Aa	96,00Aa	101,46Aa	16,22
CV (%)	20,86	12,49	19,53	13,62	12,63	

<i>M. graminicola</i> populações	Cultivares/MFPA (g)					
	EPAGRI109	SCS112	SCS BRS114	Querência	BRIRga410	CV (%)
P1	90,67ABb	85,14ABb	94,17Ab	73,93Bc	90,09Abc	17,22
P2	92,94Bb	84,42BCb	106,25Aa	81,20Cc	104,74Ab	8,12
P3	85,63Bb	78,09Bb	74,62Bc	99,39Ab	85,50Bc	12,59
Test	110,60Ba	111,29Ba	108,21Ba	111,68Ba	135,45Aa	6,42
CV (%)	14,69	12,48	7,95	10,5	9,62	

MFR- Massa fresca da raiz; MFPA - Massa fresca da parte aérea; \* Médias seguidas por letras iguais e maiúsculas, na mesma linha, e, minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação; Testemunha- plantas não inoculadas; pg- cultivo pré-germinado; c- cultivo convencional.

Em relação a interferência do nematoide na massa fresca da parte aérea, dentro de cada cultivar, todas as populações interferiram negativamente em quatro das cinco cultivares de arroz irrigado comparativamente as testemunhas não inoculadas, sendo as maiores reduções observadas nas cvs. Querência e BR IRGA 410. No entanto, apesar de haver diferenças significativas nas interações com as cultivares inoculadas, efeito significativo

também foi observado entre as testemunhas das cultivares estudadas (Tabela 8).



**Figura 6** - Plantas de arroz irrigado, cultivar BRS IRGA 410 não infectadas com *M. graminicola*/testemunha (A) e infectadas com as populações P1 proveniente de Capão do Leão-RS (B); P2 de Santa Maria-RS (C); e, P3 de Camboriú-SC (D).

Estudos aplicados relacionados a agressividade de fitonematoide de espécies vegetais diversas são importantes visto a necessidade de desenvolver trabalhos voltados a resistência genética de cultivares a *Meloidogyne* spp. associados ou não a outras estratégias de manejo. Resultados semelhantes aos observados neste estudo foram verificados por Pokharel et al. (2007) estudando a agressividade de populações de *M. graminicola* em duas cultivares de arroz, no Nepal, os quais verificaram diferenças significativas entre os isolados testados quanto à severidade dos danos na cultura e ao fator de reprodução do nematoide.

Em estudos recentes conduzidos nessa mesma linha por Lima-Medina et al. (2017) no patossistema batata x *M. javanica*, evidenciou que existe interação entre cultivares e populações da mesma espécie, e, por fim, os autores relatam a importância de se selecionar populações mais agressivas

para estudos de resistência genética. Da mesma forma, Somavilla (2008) avaliando a relação entre resistência de cultivares e porta-enxertos de videira e populações de *M. ethiopica*, observou que existem populações mais agressivas que outras e que cultivares as *Vitis labrusca* foram mais suscetíveis. Mattos et al. (2016) estudando a agressividade de diferentes populações de *M. morocciensis* oriundas de áreas com vegetação nativa e de soja, em genótipos de soja, observaram que existe diferentes níveis de agressividade entre as populações e que a mais agressiva foi proveniente da mesma cultura. Trabalhos como este tema sugerem a possibilidade de relação entre a origem da população do nematoide e a agressividade sobre as plantas hospedeiras. Desta forma, tais trabalhos relatados demonstram a importância de se utilizar populações agressivas tanto em screenings para seleção de material resistente como para avaliar trabalhos de controle biológico considerando a diversidade de ambientes e dos patógenos os quais estão interagindo.

Nesse sentido, selecionou-se a população de *M. graminicola* P2 (Capão do Leão-RS) e as cultivares Querência e SCS 112 para a condução de estudos subsequentes, uma vez que P2 foi a população mais agressiva em função dos maiores danos causados nas raízes de arroz (número de galhas) e por ter se reproduzido mais, independentemente do genótipo testado. Já a escolha das cultivares se deu pela maior suscetibilidade (>FR) e pelos menores valores de massa fresca das raízes com a cultivar Querência; e, pelos menores valores de FR independentemente da população do nematoide, pelo maior impacto sobre a massa fresca da parte aérea de arroz (cv. SC 112) e pelos maiores índices de colonização radicular.

### **3.3.2 Controle biológico de *M. graminicola* pelo uso de rizobactérias**

De acordo com os resultados apresentados na tabela 9, verificou-se interação significativa entre os fatores cultivar e tratamentos bacterianos para as variáveis número de galhas e fator de reprodução do nematoide; no entanto, para promoção de crescimento de plantas, a interação não foi significativa (Tabela 10 e 11).

Analisando o efeito da microbiolização das sementes de arroz com os isolados bacterianos XT21 e XT23 no biocontrole do nematoide das galhas,

observou-se menor número de galhas nas duas cultivares tratadas com a rizobactéria XT23; e, na cultivar SC 112 com a rizobactéria XT21 (Tabela 9). Quando avaliado o efeito das bactérias sobre a reprodução do nematoide, tanto XT21 como XT23 suprimiram a multiplicação do nematoide (20-57%) em ambas as cultivares de arroz, conforme menores valores de FR apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9-** Número de galhas e fator de reprodução de *M. graminicola* em duas cultivares comerciais de arroz irrigado inoculadas com rizobactérias. Pelotas, RS.

Número de galhas				FR			
Tratamento	Querência	SCS 112	CV (%)	Tratamento	Querência	SCS 112	CV (%)
Testemunha	107,33B*a	134,33Aa	14,36	Testemunha	24,33Aa	19,80Ba	7,81
XT21	102,16Aab	108,00Ab	16,21	Xt21	15,70Ab	12,77Bc	11,97
XT23	81,67Ab	72,50Bc	19,91	Xt23	10,66Bc	16,03Ab	6,43
CV (%)	18,12	14,79		CV (%)	9,93	7,79	

\* Médias seguidas por letras iguais e maiúsculas, na mesma linha, e, minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação; FR- fator de reprodução do nematoide; Testemunha salina.

Conforme Ferraz et al. (2010), as rizobactérias apresentam mecanismos de ação variados, atuando em diferentes etapas do ciclo de vida do nematoide. Rizobactérias podem afetar o desenvolvimento de ovos e juvenis e inibir a eclosão dos juvenis por produzir compostos que degradam exsudatos radiculares que sinalizam a eclosão dos J2. Além disto, as rizobactérias podem atuar na fase de alimentação do nematoide, na mobilidade no solo em busca de raízes hospedeiras, na penetração na raiz e, durante a reprodução. Porém, levando-se em consideração a redução da reprodução de *M. graminicola* nas plantas de arroz submetidas ao tratamento com as bactérias, muito provavelmente tal efeito supressor se deu por indução de resistência da planta ao patógeno uma vez que tais rizobactérias demonstraram pequeno efeito nematicida e ovicida *in vitro*, respectivamente, sobre juvenis de segundo estágio e ovos de *M. graminicola* (Capítulo 1).

De acordo com observações realizadas em condições controladas em trabalho anterior (capítulo 1), muito provavelmente o mecanismo de ação deve estar associado à dificuldade de desenvolvimento do nematoide no interior das raízes, retardando a maturação completa da fêmea e, portanto levando mais tempo para completar o ciclo de vida. Nesse sentido, as fêmeas apresentam

dificuldades em obter reservas suficientes para a produção de ovos e é interrompida parcialmente a reprodução do nematoide, porém, mesmo que ainda ocorram danos na cultura parasitada, serão menores durante o cultivo (Vand PEER et al., 1991; WEI et al., 1991; GLICK, 1995). Ferraz et al., (2010) afirmam que a indução de resistência sistêmica é um dos possíveis mecanismos de ação das rizobactérias no controle de fitonematoides. Fabry et al. (2007a) utilizaram em seus trabalhos a bactéria *Rhizobium etli* isolado G12 para verificar o efeito da resistência sistêmica causada pela bactéria em plantas de tomate atacadas por *M. javanica*. Os autores observaram, através da técnica da raiz partida, que ocorreu resistência sistêmica nas plantas tratadas, com redução no número de ovos e galhas por sistema radicular, em 38,8 e 35,3%, respectivamente, em relação a testemunha não tratada. Porém, os autores não verificaram incremento no crescimento das plantas tratadas.

Diversos estudos demonstram o potencial de rizobactérias em controlar doenças de plantas causadas por fitonematoides, em condições de casa de vegetação e campo. Padghan e Sikora (2008) estudando a ação de *Bacillus megaterium*, isolado de raízes de arroz irrigado em Taiwan, sobre *M. graminicola*, observaram que a bactéria reduziu em 40% o ataque do nematoide, dificultando a penetração do juvenil e a formação de galhas nas raízes. Da mesma forma, Seenivasan (2011) avaliando o efeito de *Pseudomonas fluorescens* e *Purpureocillium lilacinus* no controle de *M. graminicola* através do tratamento de sementes, pela aplicação no solo e pela associação de ambos os métodos de veiculação, verificou que a microbiolização das sementes com *P. fluorescens* foi mais efetiva no controle do fitonematoide, além de melhorar os parâmetros vegetativos da planta e aumentar rendimento de grãos. Em outro patossistema, Aballay e colaboradores (2012) observaram que entre 16 cepas de rizobactérias isoladas da rizosfera de videira, sete foram eficientes na redução de danos e reprodução do nematoide *Meloidogyne enterolobii*. Além disto, as bactérias promoverem aumento do diâmetro das raízes das plantas tratadas. Comportamento semelhante foi observado em diferentes estudos onde foi relatada a interferência de rizobactérias sobre fitonematoides do gênero *Meloidogyne*, como *M. incognita* (BECKER et al., 1988; KOKALIS-BURELLE et al., 2002;

HUANG et al., 2010) em tomate e pepino, soja e cenoura respectivamente e *M. exigua* (OLIVEIRA et al., 2007) em café.

Colaborando com os resultados encontrados neste trabalho, Ravari e Moghaddam (2015) testando cepas de *Bacillus thuringiensis* contra *Meloidogyne javanica*, em casa de vegetação, concluíram que a bactéria testada reduziu em 51% o número de galhas em plantas de tomate inoculadas com ovos e J2 de *M. javanica*. Em trabalho recente, Zhou e colaboradores (2016) observaram que cepas de *Bacillus methylotrophicus* e *Lysobacter antibioticus* foram eficientes no controle de *M. incognita* em tomateiro sob condições de campo. Além disto, *B. methylotrophicus* foi relacionado como agente de controle contra *Magnaporthe oryzae*, um fungo causador de importante e devastadora doença na cultura do arroz (SHAN et al., 2013). Da mesma forma, Tabatabaei e Saeedizadeh (2017), estudando a influência de *P. fluorescens* sobre *Meloidogyne javanica* em plântulas de leguminosas observaram o potencial de redução de danos quando aplicado esta bactéria em associação com *Rhizobium leguminosarum* pv. *phaseoli*, além de incremento da produtividade. Os autores argumentam que a mistura dos microorganismos proporcionou maior eficiência no controle do nematoide e isto se deve, provavelmente, pela interação positiva entre os organismos que aumentaram a nodulação das plântulas e reduziram a multiplicação do nematoide.

O controle de nematoides utilizando microorganismos não é tão efetivo quanto o uso de produtos químicos sintéticos, porém contribui para a redução da população do nematoide, evitando efeitos adversos ao ambiente e ao homem ocasionados pelo uso de nematicidas químicos (TABATABAEI; SAEEDIZADEH, 2017). Na avaliação do efeito dos tratamentos bacterianos sobre o desenvolvimento das plantas de arroz, não houve interação significativa entre os fatores. Para a variável massa fresca das raízes, observou-se diferenças significativas apenas para o fator cultivar (Tabela 10), e para massa fresca da parte aérea e número de perfilhos, não houve efeito significativo de ambos os fatores sobre os tratamentos (Tabela 11).

**Tabela 10** - Massa fresca das raízes de plantas de arroz irrigado proveniente de sementes microbiolizadas com rizobactérias e inoculadas com *M. graminicola*, independentemente da cultivar. Pelotas, RS.

Cultivares	Peso massa fresca das raízes (g)
SCS 112	64,25a
Querência	48,83b
CV (%)	16,58

\* Médias seguidas por letras iguais e minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação.

**Tabela 11** - Massa fresca da parte aérea e número de perfilhos/planta de plantas de arroz irrigado proveniente de sementes microbiolizadas com rizobactérias e inoculadas com *M. graminicola*, independentemente da cultivar. Pelotas, RS.

Tratamentos Bacterianos	Peso da massa fresca da parte aérea (g)	Número de perfilhos/planta
Testemunha	58,11a <sup>NS</sup>	4,91 a
XT21	58,95 a	5,09 a
XT23	52,03 a	5,16 a
CV (%)	16,58	13,64

\* Médias seguidas por letras iguais e minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação; NS- não significativo; Testemunha salina.

Apesar de ter sido observado, anteriormente, efeito de ambos os isolados bacterianos na promoção de crescimento de plantas em arroz irrigado (cap. 1), não foi possível detectar efeito dos tratamentos nesse trabalho. Outros autores encontraram resultados semelhantes ao estudar o efeito de rizobactérias no controle de patógenos e na promoção de crescimento. Mahdy et al. (2001) que, estudando o efeito de *Rhizobium etli* isolado G12 sobre *M. incognita* em tomateiro, não encontraram diferenças significativas nos parâmetros de crescimento de plantas, embora a bactéria tenha controlado o nematoide. Colaborando com esses resultados Sikora et al. (2005), estudando a ação de *Bacillus subtilis* para o controle de *M. incognita*, *M. arenaria* e *Rotylenchulus reniformis* em algodão, amendoim e beterraba, não encontraram resultados para promoção de crescimento das plantas testadas embora a bactéria tenha sido efetiva para o controle dos respectivos nematoides. No entanto, os motivos pelo qual não foram observados incrementos no desenvolvimento das plantas, nesse estudo, podem estar relacionados condição de irrigação das plantas, uma vez que todos ensaios anteriores de biocontrole haviam sido conduzidos em solo não saturado (sem lâmina d'água). Além, a falta de um tratamento com plantas não inoculadas com *M. graminicola* dificultou a avaliação da agressividade do patógeno. Nesse sentido, a repetição desse trabalho testando-se as duas condições de irrigação com a adição de



uma testemunha não inoculada pode auxiliar na interpretação desses resultados a fornecer subsídios para entender tais interação complexas.

### 3.3.3 Eficiência de rizobactérias no desenvolvimento de plantas e produção de sementes de arroz irrigado

Avaliando o efeito da microbiolização das sementes com as rizobactérias sobre o desenvolvimento das plantas de arroz BRS Querência, em condições de campo, verificou-se que todos os tratamentos com XT21 e XT23 associados ou não à incorporação com finos de xisto ao solo, proporcionaram aumento significativo para a maioria das variáveis analisadas conforme resultados apresentados na tabela 12.

**Tabela 12** - Diâmetro do caule, altura, peso da parte aérea, raiz e sementes de plantas de arroz BRS Querência submetidas ou não à tratamento com as rizobactérias XT23 e XT21, em parcelas incorporadas ou não com finos de xisto. Pelotas, RS.

Tratamentos	Diâmetro (mm)	Altura (cm)	MFPA (g)	MFR (g)	PS/planta (g)
Test.não microbiolizada	3,80b	53,12c	3,44c	4,35d	0,66e
Sem. não microb. + FX	3,78b	52,00c	4,71b	9,11a	1,10c
Microb. sementes XT21	3,70b	57,66ab	3,81c	5,08c	0,92d
XT21 + FX	3,71b	62,21a	6,47a	6,05b	1,93a
Microb. sementes XT23	3,71b	51,50c	6,47b	6,47b	1,71b
XT23 + FX	4,19a	57,20b	5,98b	5,98b	1,81ab
CV (%)	10,67	9,19	14,43	10,97	18,24

\*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade; MFPA - Peso da massa fresca da parte aérea; PMFR- Peso da massa fresca da raiz; Sem.- sementes; PS- produção sementes FX- finos de xisto.

Em relação a massa fresca da parte aérea, a microbiolização das sementes com XT23 associada ou não ao FX e os tratamentos FX e FX + XT23 também proporcionaram aumento significativo comparativamente a testemunha (Tabela 12). Na avaliação da altura das plantas, todos os tratamentos com ambas bactérias promoveram aumento significativo; e, para diâmetro do caule, apenas a microbiolização da semente com XT23 + FX diferiu significativamente da testemunha, sendo, no geral, o tratamento com melhor desempenho para os diferentes parâmetros avaliados.

O aumento significativo das variáveis de desenvolvimento vegetativo das plantas de arroz, podem estar associadas ao aumento da disponibilidade de nutrientes por rizobactérias e, também, pela produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, relacionada com a ação

promotora dessas bactérias (ETSAMI et al., 2014). Foi verificado anteriormente que estes isolados selecionados são capazes de produzir auxina, onde a rizobactéria XT23 (*Micrococcus luteus*), se destacou na produção do composto. Estes resultados estão de acordo com os relatos de Etsami et al. 2014. Os autores estudaram, em área cultivada com trevo em sucessão com arroz irrigado no Irã, isolados de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* provenientes da rizosfera e do interior de nódulos das plantas de trevo com objetivo de verificar a produção de compostos relacionados a promoção de crescimento e à proteção de plantas de arroz contra patógenos fúngicos. Entre os diversos compostos estudados, os pesquisadores verificaram que a produção da enzima (ACC) deaminase e do hormônio IAA por rizobactérias e bactérias endofíticas foram mais efetivos para o desenvolvimento das plantas de arroz se comparado aos demais compostos. Neste estudo *P. putida* e *P. fluorescens* aumentaram de forma significativa a colonização das raízes e também promoveram um maior comprimento das raízes das plantas tratadas. Da mesma forma, Glick (2014) afirma que a produção de (ACC) deaminase por rizobactérias é fundamental para que ocorra benefícios às plantas, pois a ação deste composto reduz o nível de etileno das plantas que em grandes quantidades torna-se fator de estresse aos cultivos.

O tratamento das sementes de arroz com os isolados bacterianos selecionados demonstrou ter influência positiva nos parâmetros de crescimento de plantas e produção de arroz, onde os resultados de produção de sementes foram maiores nos tratamentos com as bactérias em comparação com a testemunha não microbiolizada. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os encontrados por Seenivasan et al.(2010) que, microbiolizaram sementes de arroz com *Pseudomonas fluorescens* e o fungo *P. lilacinus* e, verificaram que além de ter proporcionado controle de *M. graminicola*, relacionando o biocontrole ao aumento do conteúdo de fenol, peroxidase e quitinase em plantas de arroz tratadas com *P. fluorescens*, o tratamento bacteriano resultou em aumento significativo na produção de grãos, (20,6% a 26,9%), além de incrementos no desenvolvimento de plantas, como maior altura, massa fresca e comprimento das raízes e número de perfilhos.

Nos tratamentos com finos de xisto houve incremento da produção de sementes de arroz que adicionado à bactéria XT21, proporcionou o melhor desenvolvimento. Finos de Xisto é um produto da rocha de xisto, de onde a bactéria foi isolada. Provavelmente esse incremento se deve à presença de microorganismos que estão a contribuir para o maior desenvolvimento produtivo. O potencial de *M. luteus* e *A. pascens* está provavelmente correlacionado com a capacidade de colonização radicular, além da produção de compostos. E et al. (2017) inocularam a bactéria *Paenibacillus polymyxa* (SQR21) em raízes de melancia para estudar a interação entre a bactéria inoculada e as proteínas da planta. Através de análises proteômicas, os autores verificaram que houve grande modificação na expressão de proteínas das plantas inoculadas com a bactéria. Os resultados deste trabalho indicam que o tratamento nas raízes de melancia com *P. polymyxa* promoveu o crescimento das plantas por aumentar o potencial de proteínas ligadas ao metabolismo de carboidratos, sistema de transporte de nutrientes e regulação de informações genéticas.

É indispensável que pesquisadores invistam cada vez mais seus estudos e esforços para a compreensão dos mecanismos de ação de rizobactérias, principalmente, quando em interação com outros seres vivos, como plantas cultivadas, fitopatógenos e demais organismos benéficos, além de técnicas para manejar produtos à base destes microorganismos. Ao longo dos anos, muitos desafios de base técnica na agricultura foram superados, hoje as necessidades e as dúvidas são mais complexas, como produzir mais para alimentar uma população crescente sem agredir o ambiente e integrar métodos de cultivo existentes. Conhecimentos sobre a biologia de bactérias promotoras de crescimento de plantas são fundamentais para colaborar com o incremento de produção sem agressão ao ambiente, melhorando a produção agrícola com sustentabilidade.

### **3.4 Conclusão**

- Existem populações de *M. graminicola* mais agressivas e cultivares de arroz irrigado mais suscetíveis;
- As rizobactérias XT21 (*Arthrobacter pascens*) e XT23 (*Micrococcus luteus*) são efetivas no biocontrole do nematoide das galhas em plantas de arroz irrigado em condições de casa de vegetação;
- Em condições de campo as plantas de arroz da cultivar BRS Querência provenientes da microbiolização de sementes com as rizobactéria XT23 e XT21 apresentaram melhor desenvolvimento vegetativo;
- A veiculação das rizobactérias XT21 e XT23 associada aos finos de xisto incrementa a produção de sementes de arroz.

## **4 CAPÍTULO III – Avaliação da resistência genética de cultivares de morangueiro ao nematoide das galhas e das lesões radiculares e prospecção do emprego de rizobactérias na promoção de crescimento da cultura**

### **4.1 Introdução**

O Brasil é destaque mundial na produção de alimentos, como carne, cereais, frutas e hortaliças. Dentre as hortaliças, o morangueiro, *Fragaria x ananassa* (Duch), espécie vegetal originária da Europa, (HANCOCK, 1999), é mundialmente cultivado, principalmente em decorrência da alta produtividade e do gosto atrativo, é considerada a espécie de maior relevância econômica e social dentre as pequenas frutas (ANTUNES et al., 2010). A nível mundial, os principais produtores são a China, com 3.113,000 ton. seguido por Estados Unidos (1.371,573 ton.) e México (458,972 ton.). Na América do Sul, os maiores produtores são Colômbia, Venezuela, Chile, Peru, Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Equador, conforme dados da FAO (2014), sendo quase a totalidade dessa produção proveniente de cultivo no solo (COCCO, 2014).

No Brasil, a estimativa de produção de morangueiro atualmente é de cerca de 130 mil ton. e área cultivada em torno de 4.000 ha, tendo à frente Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul (ANTUNES et al., 2014). No Rio Grande do Sul as principais regiões produtoras são o Vale do Rio Caí e a Serra Gaúcha, com produção destinada a mesa e, a região de Pelotas produzindo morangueiros, principalmente, para a indústria. Nos últimos anos tem ocorrido um incremento no cultivo do morangueiro em sistemas fora do solo, utilizando-se substratos, especialmente no Rio Grande do Sul, onde esta modalidade de cultivo vem substituindo o cultivo tradicional devido às dificuldades com a mão de obra para os tratos culturais e aos problemas fitossanitários da cultura

(RADIN et al., 2011). Porém na maior parte das regiões produtoras, o sistema de cultivo ainda é em solo (COCCO, 2013). O morangueiro é uma espécie perene, no entanto é cultivada como anual, principalmente por questões sanitárias e fisiológicas (RONQUE, 1998).

Entre os desafios no cultivo do morangueiro, os problemas fitossanitários afetam a cultura e os fitonematoides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, quando estão em níveis elevados no solo podem afetar seriamente o desenvolvimento das plantas parasitadas (MAAS, 1998; GOMES, 2003). Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são pragas polípagas e causam grandes danos em várias culturas anuais e perenes associadas a perdas de rendimento (SHARMA et al., 2000; FRANZENER et al., 2009; LIMA-MEDINA et al., 2014). Da mesma forma, os nematoides de lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.), o segundo grupo de fitonematoides mais importante para a agricultura brasileira, parasita várias culturas como soja, aveia, milho, milheto, girassol, cana-de-açúcar, árvores frutíferas, além de outras espécies comuns de plantas cultivadas (GOMES et al., 2006a; SEVERINO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010; LIMA-MEDINA et al., 2014).

Entre as medidas de manejo, a principal estratégia no controle de fitonematoides em morangueiro é o uso de material resistente. No entanto, pouco se conhece sobre a resistência das cultivares de morangueiro em relação as principais espécies do nematoide das galhas e das lesões de maior ocorrência (LIMA et al., 2014), especialmente em regiões de clima subtropical. Além disso, em nossas condições, não há nematicida com registro de uso para a cultura (AGROFIT, 2017). Nesse sentido, o emprego de práticas de manejo de fitonematoides como a biofumigação (LIMA, 2008) e o uso de microorganismos promotores de crescimento tem demonstrado algum potencial (ERTUK, et al., 2012), no entanto, poucos estudos tem sido conduzidos na cultura utilizando-se rizobactérias para incrementar a produção e ou no manejo de tais pragas na referida hortaliça.

Considerando a escassez de informação relacionada ao controle de fitonematoides no morangueiro, a falta de estudos relacionadas ao incremento da produção pelo uso de produtos biológicos e a importância econômica da cultura para o Rio Grande do Sul (SANHUEZA et al., 2005), dentre outras

regiões brasileiras de cultivo, foram objetivos deste trabalho: a) avaliar a resistência de cultivares de morangueiro a diferentes espécies *Meloidogyne* e *Pratylenchus* relacionadas às condições brasileiras de cultivo; e, b) prospectar o potencial de rizobactérias pré-selecionadas para o biocontrole de fitonematoides e promoção de crescimento de plantas de morangueiro.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Avaliação da resistência de cultivares de morangueiro a *Meloidogyne* spp. e a *Pratylenchus* spp.

Avaliou-se a reação de oito cultivares de morangueiro a quatro espécies de *Meloidogyne* spp. e duas espécies do nematoide das lesões radiculares, *Pratylenchus* spp. em condições de casa de vegetação e no laboratório de Fitopatologia/ Nematologia da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. Mudanças de morangueiro das cultivares Festival, Monterrey, Camino Real, San Andreas, Camarosa, Oso Grande, Aromas e Albion, obtidas a partir de cultura de tecidos, foram utilizadas para o estabelecimento do ensaio.

Para realização deste estudo, populações puras de *M. javanica* Est J3, *M. arenaria* Est A2, *M. incognita* Est I2 e *M. hapla* Est H2, cultivadas e mantidas em tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.) cv. "Rutgers" foram utilizadas na avaliação da reação do morangueiro ao nematoide das galhas; e, para o ensaio com o nematoide das lesões radiculares, foram utilizadas populações puras de *Pratylenchus zeae* e *P. brachyurus*, mantidos e reproduzidos em sorgo '506', em casa de vegetação. O inóculo das diferentes espécies de *Meloidogyne* foi obtida a partir do processamento das raízes conforme metodologia de Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981); e, o inóculo de *Pratylenchus* spp., foi obtido conforme Coolen e D'Herde (1972).

Mudas das diferentes cultivares de morangueiro cultivadas em vasos com solo esterilizado, foram inoculadas com 5.000 óvulos + juvenis de segundo estágio de cada espécie de *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M.*

*javanica* ou *M. hapla*) ou 1.000 espécimes de *Pratylenchus* (*P. zaeae* ou *P. brachyurus*), separadamente, por planta. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado e com seis repetições por tratamento. Plantas de tomateiro "Rutgers" ou de sorgo '506', inoculada com o mesmo nível de inóculo do nematoide das galhas ou das lesões, foram utilizadas como testemunhas suscetíveis.

Decorridos 90 dias da inoculação, as raízes de cada planta foram avaliadas quanto ao número de galhas (transformados em  $\sqrt{x + 1}$ ); e a seguir, processadas para extração de ovos + J2 (HUSSEY & BARKER, 1973 modificado por BONETTI; FERRAZ) e cálculo do fator de reprodução (FR) de cada espécie de *Meloidogyne* (OOSTEMBRINK, 1966). Para o cálculo da população final de espécies *Pratylenchus* (espécimes), as raízes de diferentes plantas foram processadas pelo método Coolen e D'Herde (1972). Considerou-se como imune, aquelas cultivares onde o nematoide apresentou FR=0; resistentes, FR<1,00; e, suscetíveis, FR>1,00. Posteriormente, os valores de número de galhas e FR foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Scott & Knott a 5%, utilizando o software SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

#### **4.2.2 Avaliação *in vitro* da colonização radicular de raízes de morangueiro por rizobactérias selecionadas para o biocontrole de *M. graminicola* e promotoras de crescimento de plantas de arroz**

Avaliou-se o potencial de colonização *in vitro* de duas rizobactérias (XT21- *Arthrobacter pascens* e XT23- *Micrococcus luteus*) selecionadas para o biocontrole do nematoide das galhas e promoção de crescimento de arroz (Capítulo 1) em três cultivares de morangueiro.

Os sistemas radiculares de plântulas de morangueiro das cvs. Camarosa, Diamante e Festival, obtidas a partir da cultura de tecido, foram primeiramente submetidos a três lavagens sucessivas com água esterilizada. A seguir, o sistema radicular das plantas de cada cultivar foi microbiolizado por 30", na suspensão bacteriana dos isolados XT21 e XT23, previamente ajustadas em espectrofotômetro (OD 0,5 = 540), utilizando-se 8 repetições por tratamento em esquema fatorial 3 x 3. Como testemunhas foram utilizadas



plântulas das mesmas cultivares cujas raízes foram imersas somente em solução salina a 1% pelo mesmo período de tempo. Após este período, cada plântula foi fixada em tubos de ensaio esterilizados contendo Gelright (1,5%), conforme descrito por Queiroz et al (2006), e incubada a 25°C, sob fotoperíodo de 12h luz. A partir dos 20 dias, cada plântula foi avaliada diariamente, quanto à percentagem de colonização das raízes pelas respectivas bactérias conforme escala de notas de Habe & Uesugi (2000). Posteriormente, os valores de índices de colonização de ambos os isolados bacterianos, obtidos nas diferentes cultivares de morangueiro, foram submetidos a ANOVA, sendo as médias dos diferentes tratamentos comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade utilizando-se o programa SASM.

#### **4.2.3 Avaliação do desenvolvimento de plantas de morangueiro microbiolizadas com rizobactérias quanto à promoção de crescimento**

Primeiramente, mudas de morangueiro das cultivares Diamante, Camarosa e Festival, obtidas da cultura de tecidos, tiveram seus sistemas radiculares lavados em água corrente. Em seguida, as raízes das plantas de cada cultivar foram imersas individualmente em suspensão bacteriana do isolado XT23 ou XT21 previamente preparadas conforme descrito no item 4.2.2 por um período de 1 hora. Plantas das mesmas cultivares de morangueiro foram mantidas em solução salina pelo mesmo período de tempo foram consideradas como testemunhas.

A seguir, as mudas de cada tratamento foram plantadas em copos plásticos de 500mL contendo solo autoclavado e mantidas em casa de vegetação, utilizando-se 6 repetições para cada tratamento. Decorridos 70 dias da microbiolização e transplante, as raízes de cada planta foram separadas da parte aérea, pesadas e avaliadas quanto à massa fresca da parte aérea e à massa fresca da raiz. Posteriormente, os valores das diferentes variáveis foram submetidos a ANOVA, sendo as médias de cada tratamento comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade pelo programa SASM.

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Avaliação da resistência de cultivares de morangueiro a *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 13, a maioria das cultivares de morangueiro foi resistente ou imune as espécies de nematoides testadas. Somente as cvs. Camarosa e Oso Grande foram suscetíveis a *M. arenaria*, além disto, Camarosa também foi suscetível a *M. hapla* em comparação com o controle suscetível. A presença de galhas nas raízes das plantas inoculadas com *Meloidogyne* spp. foram detectados nas cultivares suscetíveis (Figura 7). Avaliando a reação de morangueiro aos nematoides de lesões radiculares, todas as cultivares testadas se comportaram como resistentes ou imunes a ambas as espécies (Tabela 13).

**Tabela13** – Reação de cultivares de morangueiro a diferentes espécies de nematoide das galhas e das lesões radiculares. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

CV (%)	<i>M. incognita</i>			<i>M. arenaria</i>			<i>M. javanica</i>			<i>M. hapla</i>			<i>P. zeae</i>		<i>P. brachyurus</i>	
	Galhas	FR	R	Galhas	FR	R	Galhas	FR	R	Galhas	FR	R	FR	R	FR	R
Controle	199,16	7,11	S <sup>1</sup>	352,66	16,33	S <sup>1</sup>	345	24,13	S <sup>1</sup>	1150	24,39	S <sup>1</sup>	9,41	S <sup>2</sup>	7,51	S <sup>2</sup>
Camarosa	0.00 <sup>ns</sup>	0.00a*	I	123.00b	2.82c	S	0.00 <sup>ns</sup>	0.08b	R	15.00b	1.40b	S	0.88a	R	0.07b	R
Oso Grande	0.00	0.00a	I	105.00b	2.01c	S	0.00	0.12b	R	0.00a	0.10a	R	0.60b	R	0.15a	R
Monterrey	0.00	0.00a	I	0.00a	0.01b	R	0.00	0.04b	R	0.00a	0.01a	R	0.00c	I	0.00b	I
Festival	0.00	0.00a	I	0.00a	0.02b	R	0.00	0.12b	R	0.00a	0.01a	R	0.61b	R	0.00b	I
San Andres	0.00	0.21b	R	0.00a	0.18b	R	0.00	0.12b	R	0.40 <sup>a</sup>	0.01a	R	0.00c	I	0.00b	I
Aromas	0.00	0.03a	R	0.00a	0.14b	R	0.00	0.12b	R	0.00a	0.17a	R	0.64b	R	0.81a	R
Camino Real	0.00	0.00a	I	7.00c	0.11b	R	0.00	0.09b	R	0.00a	0.01a	R	0.00c	I	0.00b	I
Albion	0.00	0.00a	I	0.00a	0.00a	I	0.00	0.00a	I	7.40b	0.25a	R	0.18b	R	0.07	R
CV (%)	-	15.45		21.55	16.23		-	15.13		9.7	11.22		9.91		11.12	

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

1- Testemunha: tomate, cv. Rutgers; 2- Testemunha: sorgo, cv. BRS 506; R-reação; FR- fator de reprodução; S-suscetível; I-imune; R- resistente



**Figura 7** - Sistema radicular de plantas de morangueiro com galhas causadas por *Meloidogyne arenaria* (a) e *Meloidogyne hapla* (b) na cultivar Camarossa; e, por *M. arenaria* na cultivar Oso Grande (c). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2017.

Em outros estudos sobre a resistência genética de morangueiro a *Meloidogyne* spp., 'Camarosa', 'Oso Grande', 'Aromas', 'Camino Real', 'Santa Clara' e 'Ventana' comportaram-se como imunes a *M. enterelobii* (FREITAS et al., 2016) e as três primeiras cultivares, foram resistentes a *M. ethiopica* (SOMAVILLA et al., 2006). Embora existam poucos estudos sobre a resistência genética do morangueiro a espécies de *Meloidogyne* relacionadas a regiões tropicais e subtropicais, a reação das cultivares testadas para *M. arenaria* e *M. incognita* foi confirmada (GOMES et al., 2006b, BRUM et al., 2012). No entanto, Pinkerton. et al. (2005), avaliando a reação de mais de 30 genótipos de morangueiro a *M. hapla* observaram que as cultivares 'Camarosa' dentre outros genótipos testados foram resistentes ao nematoide.

Entretanto, Pinkerton. et al. (2005) avaliando a reação de vários genótipos de morangueiro a *M. hapla* e *P. penetrans*, verificou que tanto 'Camarosa' com as demais cultivares foram resistentes a ambos nematoides. Dessa forma, os resultados obtidos nesse estudo, evidenciam a necessidade de condução de trabalhos adicionais de resistência genética associado a agressividade de diferentes populações da mesma espécie conforme verificado por Dale; Potter (1998) em morangueiro; e; por Loubserand; Meyer (1984) e Lima-Medina et al. (2017) em outros patossistemas. Além disso, não há informação disponível sobre resistência genética de morangueiros a espécies

do nematoides das lesões adaptadas a climas tropicais e subtropicais, como *P. zae* e *P. brachyurus*.

Considerando que a maioria das cultivares de morangueiro foi considerada como hospedeira desfavorável para a maioria das diferentes espécies de *Meloidogyne* e *Pratylenchus* testadas, esses resultados são de grande importância no estabelecimento de estratégias de controle dessas pragas, visando a sua supressão no solo. Portanto, o uso de cultivares resistentes de morangueiro representa uma alternativa viável na implementação de sistemas de rotação de culturas para o manejo dessas pragas, tornando-se, assim, uma maneira eficiente e econômica de reduzir suas populações em áreas infestadas (CARNEIRO et al., 2000; FERRAZ; FREITAS, 2004, LIMA et al., 2008, FREITAS et al., 2016).

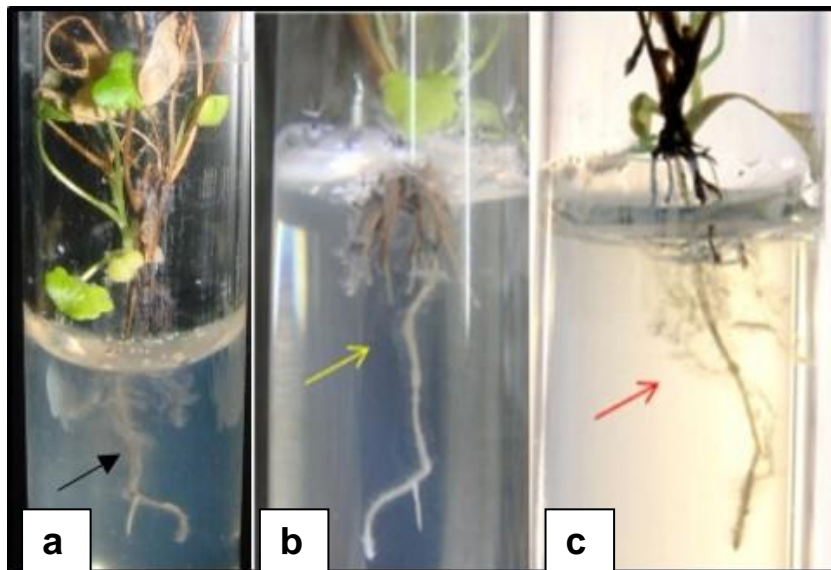
#### 4.3.2 Avaliação *in vitro* da colonização radicular de raízes de morangueiro por rizobactérias selecionadas para o biocontrole de *M. graminicola* e promotoras de crescimento de plantas de arroz.

Na avaliação da colonização radicular das plântulas de morangueiro, verificou-se interação significativa entre cultivares e tratamentos bacterianos ( $P < 0,05$ ). Verificou-se que, independentemente do isolado, a cv. Camarosa apresentou maiores índices de colonização das raízes. No entanto, quando avaliada a intensidade de colonização dentro de cada cultivar, ambos isolados não diferiram entre si mas, diferenciaram-se da testemunha, sendo os maiores valores verificados na cv. Camarosa, conforme pode ser observado na tabela 14 e na figura 8.

**Tabela 14** - Colonização radicular *in vitro* de raízes de mudas de morangueiro das cvs. Camarosa, Festival e Diamante pelas rizobactérias XT21 e XT23 em comparação com as respectivas testemunhas cujas raízes foram tratadas com solução salina.

Isolados	Cultivares			CV (%)
	Camarosa	Festival	Diamante	
Bacterianos				
XT21	2,7Aa*	2,1Ba	1,5Ba	18,2
XT23	2,6Aa	1,5Ba	1,3Ba	11,3
Testemunha	0,0b	0,0b	0,0b	0,0
CV (%)	21,12	12,10	15,62	-

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e, minúscula, na linha, não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5%.



**Figura 8** - Colonização *in vitro* de raízes de morangueiro cvs. Camarosa, Festival e Diamante (esquerda para direita) pelas rizobactérias XT21 (a e b) e XT23 (c).

#### 4.3.3 Avaliação do desenvolvimento de cultivares de morangueiro microbiolizadas com rizobactérias quanto à promoção de crescimento

Verificou-se efeito da cultivar e do tratamento bacteriano sobre a massa fresca da parte aérea e das raízes de morangueiro, no entanto, não houve interação dos tratamentos sobre tais variáveis. De acordo com a tabela 15, a cultivar Festival apresentou maior massa fresca de raiz e da parte aérea, embora a cv. Diamante não tenha diferido de "Festival" para a última variável.

**Tabela 15** - Massa fresca de raiz e da parte aérea em três cultivares de morangueiro independentemente da microbiolização das raízes com bactérias.

Cultivar	Massa fresca raízes	Massa fresca parte área
	----- (g) -----	
Festival	13,76a*	11,78a*
Camarosa	10,03b	9,24b
Diamante	5,35c	12,24a
CV (%)	18,21	20,38

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

Analisando-se o efeito das rizobactérias, independentemente da cultivar testada, o isolado bacteriano XT 23 promoveu aumento do peso fresco da parte aérea e das raízes dos morangueiros, diferindo estatisticamente da testemunha não microbiolizada (Tabela 16). Pela observação visual das raízes

da cv. Festival e Camarosa, percebeu-se um pequeno aumento no volume de raízes secundárias das plantas microbiolizadas com o isolado XT23, porém tal variável não foi mensurada.

**Tabela 16** - Massa fresca de raiz e da parte aérea em mudas de morangueiro previamente microbiolizadas com duas bactérias independentemente, da cultivar de morangueiro.

<b>Bactéria</b>	<b>Massa fresca de raízes</b>	<b>Massa fresca da parte área</b>
	----- (g)-----	
XT23	10,55a*	12,24a*
XT21	9,21b	11,02ab
Test não microb.	9,12b	9,99b
CV (%)	18,21	20,38

\*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Duncan a 5%.

Resultados com incremento de produtividade também foram obtidos com o mesmo isolado (XT23) em plantas de arroz BR IRGA 410, previamente microbiolizadas com essa rizobactéria (Capítulo 1). A conversão de substâncias orgânicas e inorgânicas em nutrientes prontamente disponíveis para a planta é o maior benefício que as rizobactérias promovem aos cultivos (ERTURK ; ERCISLI ; CAKMAKC, 2012). Em trabalho conduzido por Erdogan et al. (2016) foi avaliado o efeito de (ACC) deaminase, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato, produzidos por rizobactérias, sobre parâmetros de rendimento de morangueiro, cv. Aromas. Os resultados demonstram que a inoculação de plântulas de morangueiro com bactérias *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* e *Rhodococcus erythropolis* proporcionaram aumento do rendimento de fruto e dos demais parâmetros vegetativos por ter minimizado efeitos de estresse ambiental sofrido pela planta ao mudar os conteúdos de fenóis.

Burrelle (2002) estudando o efeito do tratamento do solo com rizobactérias na promoção e crescimento de morangueiro, cv Camarosa e Sweet Charlie, relatou que as plantas tratadas com *Bacillus subtilis* e *B. amiloliquefaciens* apresentaram maiores rendimentos quando comparado com as testemunhas não microbiolizadas. Duniway et al., (2002) isolaram rizobactérias da rizosfera do morangueiro e estudaram o efeito sobre patógenos do solo e promoção de crescimento para as cultivares Camarosa e Aromas em condições de campo. O gênero *Pseudomonas* prevaleceu entre os isolados encontrados e aumentou os rendimentos de fruto em Camarosa, mas

teve pequenos efeitos no rendimento em Aromas. Os autores afirmam que os efeitos de rizobactérias na promoção de crescimento de plantas de morangueiro depende do tratamento utilizado no solo, da cultivar, do isolado bacteriano e, provavelmente da localização.

A microbiolização de sementes e/ou raízes de espécies diversas com *M. luteus* tem demonstrado incrementos no desenvolvimento das plantas e no rendimento das culturas. Bora et al. (1993) estudaram a capacidade de diversos residentes do filoplano em controlar *Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae*, agente causal da mancha bacteriana no feijoeiro, na Índia. Os resultados demonstraram que entre os isolados, *M. luteus* foi efetivo para o controle da doença. No entanto, esse é o primeiro registro de tal rizobactéria promovendo crescimento na cultura do morangueiro. Embora, não tenha sido avaliada a influência das rizobactérias XT21 e XT23 no biocontrole de *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. no presente estudo, Hackenberg et al. (1997) avaliando o potencial de *P. chlororaphis* em morangueiro, verificou redução significativa da penetração de *P. penetrans* em raízes das plantas. Nesse sentido, a condução de trabalhos visando o biocontrole de *M. arenaria* e *M. hapla* em cultivares amplamente cultivadas e suscetíveis a tais espécies, como Camarosa, podem representar uma alternativa no manejo desses fitopatógenos em áreas infestadas e amplamente utilizadas com esse mesmo genótipo, caso outras cultivares não sejam utilizadas por não serem viáveis economicamente.



#### 4.4 Conclusões

- A maioria das cultivares de morangueiro testadas é resistente ou imune à *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp., possibilitando que tais materiais sejam utilizados diretamente em rotação de cultura em áreas infestadas com estas espécies do nematoide das galhas e das lesões radiculares;

- Nas condições em que foi realizado o presente estudo, a microbiolização de raízes de morangueiro com o isolado bacteriano XT 23 (*Micrococcus luteus*) promove o desenvolvimento das plantas, independentemente da cultivar testada.

## 5 Conclusão Geral

Existem rizobactérias biocontroladoras de *M. graminicola* que promovem o crescimento de plantas de arroz irrigado e aumentam o rendimento da cultura em condições de campo, além de promoverem o desenvolvimento de diferentes cultivares de morangueiro, que em sua grande maioria, são resistentes a *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp.

## 6 Referências

ANTUNES, L.E.C.; DUARTE. F.J.D; CALEGARIO. F.F; COSTA. H.; REISSER.J.C. 2007. Produção integrada de morangueiro no Brasil. Informe Agropecuário. Belo Horizonte. v.38. n.236. p. 34-39, 2007.

ANTUNES, L.E.C.; PERES, N. Strawberry production in Brazil and South America. *International Journal of Fruit Science*. v.13. p.156-161, 2013.

ABALLAY, E.; ORDENES, P.; MARTENSSON, A.; PERSSON, P. Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines. **European Journal Plant Pathology**. v.135, p.137-145, 2013.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdam: Academic Press, 2005.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acesso em: 24 ago. 2017

ALMAGHRADI, A.O.; MASSOUD, S.I.; ABDELMONEIM, T.S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.20, p.57- 61, 2013.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa CNPMA, 1991. p.1-5

BISOGNIN, A.C. **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**, 2017. 93f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria, RS. Frederico Westphalen. 2017.

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

BORA, L. C.; GANGOPADHYAY, S.; CHAND, J. N. Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, Udaipur, v.23, p.162-168, 1993.

BRIDGE, J.; PLOWRIGHT, R.A.; PENG, D. **Nematodes parasites of rice**. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Agriculture. 2. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2005. 871p.

BRUM, D.; GOMES, C.B.; SOMAVILLA, L. Reação de cultivares de morangueiro a *Meloidogyne arenaria* e *M. incognita*. In: Congresso Brasileiro de Nematologia. 30. 2012b. Uberlândia. Anais... Uberlândia: UFU: ICA: SBN. 2012. p. 251-252.

BYRD, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**. v.15, n.1, p.142-143, 1983.

CAMPOS, A.D., FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência de feijão à antracnose. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, 39 (7): 637-643, 2004.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, p.35-44, 2001.

CHRISTIE, J. R.; PERRY, V. G.; Removing nematodes from soil. **Proceedings of helminthological society of Washington.**, v.18, p.106-108, 1951.

CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; CAMPOS, A.D. Resistance of vegetable crops to *Meloidogyne* spp.: suggestion for a crop rotation. **Nematologia Brasileira**. v. 24, p. 49-54, 2000.

COCCO, Carine. **Produção e qualidade de mudas e frutas de morangueiro no Brasil e na Itália**. 2014. 124f. Tese – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2014.

COELHO JÚNIOR, J. M. Strawberry cultivars: Knowing to expand and reduce the environmental impacts. **Revista Geama**. v.5, n.1, p, 138-147, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: arroz, quinto levantamento, fevereiro/2017. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_02\\_04\\_11\\_21\\_34\\_bol\\_etim\\_graos\\_fevereiro\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_04_11_21_34_bol_etim_graos_fevereiro_2017.pdf) Acesso: em 02 fev. 2017.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Nematology and Entomology Research Station, Ghent, 1972. 77p.

E, Y.; YUAN, J.; YANG, F.; WANG, L.; MA, J.; LI, J.; PU, X.; RAZA, W.; HUANG, Q.; SHEN, Q. PGPR strain *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 potentially benefits watermelon growth by re-shaping root protein expression. **AMB Express**, v.7, p.104, 2017.

ETESAMI, H.; HOSSEINI, H.M.; ALIKHANI, H.A.; MOHAMMADI, L. Bacterial Biosynthesis of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase and Indole-3-Acetic Acid (IAA) as Endophytic Preferential Selection Traits by Rice Plant Seedlings. **Journal Plant Growth Regulation**, v.33, p.654-670, 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production of cereals and share in world. Disponível em: Acesso em: 24 abr. 2017.

FACHINELLO, J.C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura. v. esp. p.109-120. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33nspe1/a14v33nspe1.pdf>.> Acesso em: 02 Nov. 2013.

FERRAZ.S.; FREITAS, L.G. O controle de fitonematoides por plantas antagonistas e produtos naturais. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais 2004. Acessado em: 27 set. 2013. Online. Disponível em: <http://jcofertilizantes.com.br/pesquisa/pesquisa16-o-controle-de-Fitonematoides.pdf>.

FRANZENER, G.; UNFRIED, J.R.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETO, C. Nematoides formadores de galha e de cisto patogênicos à cultura da soja em municípios do Oeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**. Brasília. v.29. n.2. p. 261-265. 2005.

FREITAS, V.M.S.; JOELMA, G.P.; GOMES, C.B.; CASTRO, J.M.C.; CORREA, V.R.; CARNEIRO, R.M.D.G. Host status of selected cultivated fruit crops to *Meloidogyne enterolobii*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, p. 1-13, 2016.

GARCIA, M. E.; ERNST, T.; JOHNSON, D. T.; DICKEY, D. A. Strawberry cultivars performance in high tunnels under sustainable and organic production practices in three climatic regions of Arkansas. *Acta Horticulturae: Proceedings of the VIII International Strawberry Symposium*. v.2. p. 549-553. 2017.

GLICK, B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v.169, p.30-39, 2014.

GOLDEN, A.M.; BIRCHFIELD, W. *Meloidogyne graminicola* (Heteroderidae), a new species of root-knot nematode from grass. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*., v.32, p.228-231, 1965.

GOMES, C.B.; MARCHEZAN, E.; FONTANA, I.; CARNEIRO, R.M.G.; ALMEIDA, M.R.A. Ocorrência *Meloidogyne graminicola* em Santa Maria, RS. **Ciência Rural**, v.27, p.501-502, 1997.

GOMES, C.B.; COFCEWICZ, E.T. Nematoides. In: FORTES, J.F.; OSORIO, V.A.. (Org.). *Morangueiro: fitossanidade*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2003. p. 19-22. (Frutas do Brasil. 41).

GOMES, C. B.; OLIVEIRA, C.M.; MONTEIRO, A.R. Espécies de *Pratylenchus* associadas à amora preta (*Rubus* sp.) e ao araçá (*Psidium* spp.) no Rio Grande do Sul. In: 26 Congresso Brasileiro de Nematologia. 2006a. Campos Goytacazes-RJ. Resumos do 26o Congresso Brasileiro de Nematologia. Brasília-DF: Sociedade Brasileira de Nematologia. 2006. p. p.88.

GOMES, C. B.; SOMAVILLA. L.; O.. R. P; ANTUNES, L. E. C. Avaliação da resistência de cultivares de morangueiro ao nematoide das galhas do amendoim. In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura. 2006. Cabo Frio-RJ. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura. Rio de Janeiro: SBF. 2006b. p. 325.

GOMES, A.C.M.M. **Resistência e caracterização histológica de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita***. 2006, 58p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, DF.

GOMES, C.B.; STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I. **Levantamento do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em arroz irrigado na região Sul do Brasil**. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 87). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 15p.

GOMES, C. B. **Distribuição espacial e estudo preliminar do emprego do sensoriamento remoto no monitoramento do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em lavouras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 2013. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Geografia Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.



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.

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

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S.H. (1978) Introduction of PAL and increase in phenolics in lettuce in relation the development. **Plant Physiol.** 62:31-35.

HYODO, H.; YANG, S.F. (1971) Ethylene enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. **Plant Physiol.** 47:765-770.

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.

KYNDT, T.; FERNANDEZ, D.; GHEYSEN, G. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. **Annual review of phytopathology**, v. 52, p. 135–153, 2014.

LIMA, E.A.; MATTOS, J.K.; MOITA, A.W.; CARNEIRO, R.G.; CARNEIRO, R.M.D.G. Host status of different crops for *Meloidogyne ethiopica* control. **Tropical plant pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 152-157, 2009.

LIMA. C. V.; CRUZ. F. F.; BRUM. D.; FISS. A. V.; GONÇALVES. M. A.; GOMES. C. B. Reação de cultivares de morangueiro a *Pratylenchus zaeae*. IV Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul. Pelotas. RS. 2014.

LIMA-MEDINA. I.. C. B. GOMES; V. GONZAGA. Caracterização de espécies do nematoide das lesões em batata na região sul do Brasil e reação de genótipos a *Pratylenchus brachyurus*. **Nematropica**. v. 44, p.101-106, 2014.

LIMA-MEDINA, I.; GOMES, C.B.; CORREA, V.R.; MATTOS, V.S. ; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. Genetic diversity of *Meloidogyne* spp. parasitising potato in Brazil and aggressiveness of *Meloidogyne javanica* populations on susceptible cultivars. **Nematology**, v. 19, p. 69-80, 2017.

LEMISKA. A.; PAULETTI. V.; CUQUEL. F. L.; ZAWADNEAL. M. A. C. Produção e qualidade da fruta do morangueiro sob influência da aplicação de boro. *Revista Ciência Rural*. v. 44. n. 4. abr. 2014.

LUDWIG, J.; MOURA, A.B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.48-53, 2007.

MAHDY, M., J. HALLMANN & R.A. SIKORA. 2001. Influence of plant species on the biological control activity of the antagonistic rhizobacterium *Rhizobium etli* strain G12 toward the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*, 66 (2b): 655-662.

MAAS, J.L. Compendium of Strawberry Diseases. 2ed. APS Press. St. Paul. MN. 1998.

MATTOS, V.S.; FURLANETTO, C.; SILVA, J.G.P.; SANTOS, D.F.; ALMEIDA, M.R.A.; CORREA, V.R.; MOITA, A.W.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. **Nematology**, v.00, p. 1-11, 2016.

MOTA, M.S. **Seleção de bactérias como potenciais biocontroladoras do nematoide anelado do pessegueiro (*Mesocriconema xenoplax*)**, 2012. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2012.

NEGRETTI, R.R.D.; MATTOS, V.S.; SOMAVILLA, L.; MANICA-BERTO, R.; AGOSTINETTO, D.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G.; GOMES, CESAR B. Characterization of a *Meloidogyne* species complex parasitizing rice in southern Brazil. **Nematology**, vol.20, p. 1-10, 2017.

NEGRETTI, R.R.D. **Caracterização do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivo de arroz irrigado nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e hospedabilidade de plantas daninhas e forrageiras a *Meloidogyne graminicola***, 2013. 70f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2013.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouwhoghe school**, v.66, p.1-46, 1966.

PADGHAM, J.L.; DUXBURY, J.M.; MAZID, A.M.; ABAWI, G.S.; HOSSAIN, M. Yield loss caused by *Meloidogyne graminicola* on lowland rainfed rice in Bangladesh. **Journal of Nematology**, v.36, p.42-48, 2004.

PADGHAM, J.; SIKORA, R. The potential for *Meloidogyne graminicola* biological control in rice under oxic and anoxic soil environments. **Bulletin-OILB/SRPO**, v.29, p.111- 116, 2006.

PINKERTON, J.; FINN, C. E. Responses of Strawberry Species and Cultivars to the Root-lesion and Northern Root-knot Nematodes. **Hort Science**. v. 40. n. 1, p.33-38. 2005.

POKHAREL, R. R.; ABAWI, G. S.; ZHANG, N.; DUXBURY, J. M.; SMART, C. D. Characterization of isolated of *Meloidogyne* from rice-wheat production fields in Nepal. **Journal of Nematology**, v.39, n.3, p.221-230, 2007.

POTTER, J.W.; DALE, A. Wild and cultivated strawberries can tolerate or resist root-lesion nematode. *Hortscience*, 29(9):1074–1077. 1994.

PROT, J.C.; RAHMAN, M.L. Nematode ecology, economic importance and management in rice ecosystems in South and South-East Asia. **Rice pest science and management**, p.129-140, 1994.

PROT, J.C.; MATIAS, D.M. Effects of water regime on the distribution of *Meloidogyne graminicola* and other root-parasitic nematodes in a rice field toposquence and pathogenicity of *M. graminicola* on rice cultivar UPL R15. **Nematologica**, v.41, p.219- 228, 1995.

RAVARI, S.B.; MOGHADDAM, E.M. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry14 Toxin against Root Knot Nematode, *Meloidogyne javanica*. **Plant protect**, v.51, n.1, p.46-51, 2015.

RIBEIRO. N. R.; DIAS. W. P.; SANTOS. J. M. Distribuição de fitonematoides em regiões produtoras de soja do estado de Mato Grosso. Rondonópolis: Fundação MT. 2010. p. 289-296. (Boletim de Pesquisa de Soja 2010).

SEID, A.; FININSA, C.; MEKETE, T. M.; DECRAEMER, W.; WESEMAEL, W.M.L. Resistance screening of breeding lines and commercial tomato cultivars for *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* populations (Nematoda) from Ethiopia. **Euphytica**, v. 213, p. 97, 2017.

SEVERINO. J. J.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; TESSMANN, D.J. Nematodes associated with sugarcane in sandy soils in Paraná. Brazil. **Nematropica**. v. 40, p.111-119, 2010.

SHARMA, R.D.; FONSECA, C.E.L. Efeito de *Meloidogyne javanica* no crescimento da ervilha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, n.1, p.115-120, 2000.

SHARMA, I.P.; SHARMA, A.K. Effective control of root-knot nematode disease with Pseudomonad rhizobacteria filtrate. **Rhizosphere**, v.3, p.123-125, 2017.

SOARES, M.R.C. **Caracterização isoenzimática de *Meloidogyne* spp. em arroz irrigado no noroeste do Paraná e efeito do tratamento de sementes no controle do nematoide**. 2017. 93f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá.

SOMAVILLA. L.; GOMES, C.B.; OLIVEIRA, R.P.; CARNEIRO, R.M.D.G. Resistência de cultivares de morangueiro ao nematoide das galhas *Meloidogyne ethiopica* Whitehead. 1969. **Nematologia Brasileira**. v. 30, n.3, p. 299-301, 2006.

SORIANO IR.; REVERSAT, G. Management of *Meloidogyne graminicola* and yield of upland rice in South-Luzon, Philippines. **Nematology**, v.5, p.879–84, 2003.

SOSBAI. SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Itajaí: SOSBAI, 2012, 179p.

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.

SOUSA, C.S.; SOARES, F.A.C.; GARRIDO, M.S.; ALMEIDA, G.M.C.O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 12, p. 1759-1766, 2006.

STEFFEN, R.B.; ANTON.IOLLI, Z.I.; KIST, G.P.; LUPATINI, M.; GOMES, C.B. Caracterização bioquímica do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em lavouras de arroz irrigado na região central do Rio Grande do Sul. **Ciência e Natura**, v.29, p.37-46, 2007.

TABATABAEI, F.S.; SAEEDIZADEH, A. Rhizobacteria cooperative effect against *Meloidogyne javanica* in rhizosphere of legume seedlings. **Hellenic Plant Protection Journal**. v.10, p.25-34, 2017.

TON, I.N.J.; MACHADO; J. T. M.; SOBUCKI, L.; BENATI, J. A.; ROHRIG, B.; SCHNEIDER, E. P. Controle de plantas daninhas e aspectos produtivos do morangueiro sob diferentes coberturas de solo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v.16. n.1. p. 48-53. 2017.

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

ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y.; WEI, L.; J.I., G. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato. **Crop Protection**. v.84, p.8-13, 2016.

## APÊNDICE

Apêndice A - Seleção de bactérias biocontroladoras de *Meloidogyne graminicola* e promotoras do crescimento de plantas de arroz irrigado BR IRGA 410 oriundas de sementes microbiolizadas com isolados de folhelhos pirobetuminoso em cinco agrupamentos.

<b>Grupo 1</b>					
<b>Tratamentos</b>	<b>Parte Aérea</b>	<b>Raízes</b>	<b>Nº Galhas</b>	<b>Nº Ovos</b>	<b>FR</b>
TEST.	12,4b	10,3b	180,3c	209.866,6b	69,9b
XT 02	16,2a	20,4 <sup>a</sup>	227,6b	189.433,3b	63,1b
XT 05	17,8a	14,0b	467,0a	517.633,3a	172,5a
XT 07	13,7b	11,5b	143,3c	37.500,0c	12,5c
XT 10	18,2a	13,5b	159,3c	113.633,3c	37,8c
XT11	18,2a	16,2b	138,6c	62.866,6c	20,9c
XT 13	14,6b	14,5b	263,3b	24.866,6c	82,7b



XT 14	12,8b	15,5a	78,0d	51.200,0c	17,0c
XT15	21,1a	16,4a	73,6d	146.400,0b	48,8b
XT 16	18,2a	15,5a	75,6d	77.966,6c	25,9c
XT 17	17,0a	13,3b	169,6c	142.633,3b	47,5b
XT 18	14,2a	13,7b	104,0d	16.330,0c	54,4b
XT 19	19,9a	14,5b	108,3d	181.600,0b	60,5b
<b>XT 23</b>	<b>20,4a</b>	<b>20,7a</b>	<b>89,0d</b>	<b>36.966,6c</b>	<b>12,3c</b>
XT 24	16,2a	20,4a	139,0c	183.966,6b	61,3b
XT 25	15,0a	14,5b	147,6c	92.666,6c	30,8c
XT26	18,4a	12,6b	415,6b	45.630,0c	152,1a
XT27	17,8a	15,4 <sup>a</sup>	92,3d	77.533,3c	25,8c
XT29	18,4a	20,9 <sup>a</sup>	193,3c	197.466,6b	65,9b
XT31	14,8b	13,6b	161,0c	53.966,6c	17,9c
XT33	14,4b	11,8b	145,3c	174.400,0b	58,1b
XT34	20,8a	14,1b	62,6d	46.633,3c	15,5c
XT39	10,1b	9,1b	72,0d	53.866,6c	17,0c
XT40	17,1a	15,0a	176,3c	164.200,0b	54,7b
XT41	17,8a	14,3b	433,0a	436.200,0a	145,4a
CV (%)	22,10	18,33	25,42	27,92	19,16

## Grupo 2

Tratamentos	Parte Aérea	Raíces	N° Galhas	N° Ovos	FR
TEST.	15,9a	19,1b	270,0b	136.533,3a	45,5a
XT 01	17,1a	24,5a	101,6d	53.866,6b	17,9c
XT 06	17,6a	25,9a	223,6c	79.266,6a	26,4b
XT 08	9,3b	15,5b	61,0d	86.250,0a	28,7b
XT 09	16,2a	24,1a	220,6c	102.916,6a	43,0a
<b>XT 21</b>	<b>14,6a</b>	<b>17,2b</b>	<b>6,0e</b>	<b>933,0d</b>	<b>0,29d</b>
XT 28	9,5b	14,4b	22,0e	15.433,3c	5,1d
XT 30	12,8b	20,0b	479,0a	160.550,0a	53,5a

XT 32	15,3a	17,2b	73,3d	46.933,3b	15,6c
XT 35	17,2a	22,4a	62,0d	40.100,0b	13,3c
XT 36	15,2a	18,4b	252,3b	75.483,3a	25,1b
XT 37	16,7a	22,0a	274,6b	97.150,0a	32,3b
XT 38	16,1a	24,0a	322,0b	109.316,6a	36,5b
XT 41	15,0a	23,4a	172,6c	45.316,6b	15,0c
XT 45	14,8a	16,0b	261,3b	110.650,0a	36,8a
CV (%)	17,10	21,12	27,18	25,03	18,64

### Grupo 3

Tratamientos	Parte Aérea	Raíces	Nº Galhas	Nº Ovos	FR
TEST.	10,0b	8,0b	249,3c	143.433,3b	47,8c
XTI 01	10,0b	10,2b	203,6c	53.166,6c	17,7e
XTI 02	11,2a	10,3b	147,6c	52.333,3c	17,4e
XTI 03	11,8a	11,6a	176,3c	82.933,3c	27,6d
XTI 04	10,0b	9,5b	277,6c	94.716,6c	31,5d
XTI 05	11,2a	9,9b	235,6c	64.883,3c	21,6e
XTI 06	6,8c	7,1b	461,0b	218.100,0a	72,7a
XTI 07	13,2a	10,0b	233,3c	26.983,3d	8,9e
XTI 08	10,4b	8,4b	230,6c	44.666,6c	14,8e
XTI 09	9,6b	12,4a	214,3c	56.550,0c	18,5e
XTI 10	11,2a	10,2b	415,6b	228.150,0a	76,0a
XTI 11	12,1a	10,1b	240,0c	33.066,6d	11,0e
XTI 12	12,3a	10,0b	245,6c	98.983,3c	32,9d
XTI 13	9,2b	10,7b	207,6c	90.800,0c	30,2d
XTI 14	10,7b	10,5b	207,5c	56.816,6c	18,9e
XTI 15	11,0a	9,9b	173,6c	47.703,3c	15,9e
XTI 16	12,5a	11,2a	126,6d	76.166,6c	25,3e
XTI 17	11,6a	10,7b	126,6d	43.166,6c	14,3e
XTI 18	11,9a	9,8b	166,0c	73.200,0c	24,4e

XTI 19	12,5a	10,7b	62,6d	23.316,6d	7,7e
XTI 20	11,6a	11,3a	195,6c	71.316,6c	23,7e
XTI 21	11,2a	10,8a	467,0b	258.816,7a	86,2a
XTI 22	10,8a	11,1a	319,0b	124.133,3b	29,3c
XTI 23	9,1b	10,4b	145,3c	87.200,0c	30,0d
XTI 24	11,6a	10,0b	139,3d	91.983,3c	30,6d
XTI 25	12,8a	11,1a	205,6c	91.983,3c	30,6d
XTI 26	11,9a	10,8a	205,4b	91.983,3c	30,6d
XTI 27	12,8a	11,1a	208,5b	91.983,3c	30,6d
XTI 28	12,8a	10,7b	207,3b	98.000,0c	32,6d
XTI 29	11,1a	10,7b	205,6b	92.333,3c	30,7d
XTI 30	11,3a	10,6b	244,0b	100.666,7c	33,5d
XTI 31	11,1a	10,9a	215,3b	104.383,3b	34,7d
XTI 32	10,5b	10,9a	242,0b	91.983,33c	30,6d
XTI 33	11,2a	10,7b	29,07b	134.816,7b	44,9c
XTI 34	10,4b	10,2b	219,3b	129.666,7b	43,2c
XTI 35	11,3a	10,4b	198,6b	141.983,3b	47,3c
XTI 36	11,0b	10,6b	205,6b	91.983,3c	30,6d
XTI 37	11,2a	10,6b	208,0b	171.666,7b	57,0b
XTI 38	10,6b	10,2b	238,0b	123.333,3b	41,1c
XTI 39	11,2a	9,2b	281,3b	122.833,3b	40,9c
XTI 40	10,9a	10,3b	314,6a	93.933,33c	31,3d
CV (%)	12,05	15,08	29,42	27,85	20,18

#### Grupo 4

Tratamientos	Parte Aérea	Raíces	Nº Galhas	Nº Ovos	FR
TEST.	6,6 <sup>ns</sup>	11,0 <sup>ns</sup>	257,0c	313.996,7b	104,7b
CX 01	6,9	11,8	183,0d	350.883,0b	116,9b
CX 02	6,5	12,5a	182,3d	373.886,7b	124,6b
CX 03	5,3	16,3	97,3d	266.776,7b	88,9c

CX 04	6,2	13,4	172,0d	520.996,7a	173,6a
CX 05	6,2	11,5	443,0b	525.830,0a	175,3a
CX 06	5,7	11,2	135,6d	440.776,7a	146,9b
CX 07	8,6	16,1	250,3c	561.330,0a	187,1a
CX 08	6,4	12,9	136,3d	371.663,3b	123,9b
CX 09	6,2	14,9	149,0d	391.440,0b	130,5a
CX 10	6,9	12,4	184,3d	226.553,3b	75,5c
CX 11	5,4	11,1	185,0d	497.106,7b	165,7a
CX 12	6,0	10,4	229,3c	389.330,0b	129,8b
CX 13	4,1	7,5	168,0d	363.333,3b	121,1b
CX 14	6,4	13,5	111,0d	310.440,0b	103,5b
CX 15	5,8	11,7	160,7d	429.553,3a	143,2b
CX 16	6,1	12,2	820,7a	353.220,0b	117,7b
CX 17	6,1	9,0	135,0d	322.110,0b	107,4b
CX 18	6,2	12,2	221,7c	402.440,0a	134,1b
CX 19	7,3	14,4	219,0c	354.883,3b	118,3b
CX 20	6,7	11,6	154,0d	442.773,3a	147,6b
CX 21	5,4	10,7	217,0c	393.330,0a	131,1b
CX 22	6,5	13,1	268,0c	436.440,0a	145,5b
CX 23	6,4	11,1	185,3d0	480.216,7a	160,1a
CX 24	7,5	13,7	264,7c	364.996,7b	121,7b
CX 25	7,1	13,6	225,7c	332.330,0b	110,8b
CX 26	7,1	13,8	204,0d	276.883,3b	92,3c
CX 27	6,4	13,5	443,7b	491.663,3a	163,9a
CX 28	6,8	16,7	342,7b	451.220,0a	150,4a
CV (%)	16,76	19,01	23,55	29,75	19,22

### Grupo 5

Tratamentos	Parte Aérea	Raíces	Nº Galhas	Nº Ovos	FR
TEST.	7,8 <sup>ns</sup>	8,2 <sup>ns</sup>	179,3a	419.996,7a	140,0a

FX 01	8,6	7,3	130,3a	396.663,3a	132,2a
FX 02	8,1	8,6	176,7a	467.330,0a	155,8a
FX 03	7,9	9,4	81,0b	428.883,3a	142,9a
FX 04	7,6	8,4	103,6b	305.330,0a	101,8a
FX 05	9,3	9,9	111,0b	439.106,7a	146,4a
FX 06	7,3	8,1	70,0b	334.773,3a	111,6a
FX 07	7,8a	6,5	91,3b	341.220,0a	113,7a
FX 08	7,8	10,3	137,3a	367.106,7a	122,4a
FX 09	6,1a	7,4	72,7b	378.440,0a	126,2a
FX 10	8,3	12,8	81,0b	376.773,3a	125,6a
FX 11	7,4	7,6	57,0b	542.553,3a	180,9a
FX 12	7,7	11,2	57,0b	388.110,0a	129,4a
FX 13	8,1	9,0	70,0b	263.886,7b	87,9b
FX 14	5,7	6,9	89,0b	245.330,0b	81,8b
FX 15	8,2	9,2	78,3b	540.663,3a	180,2a
FX 16	9,1	11,1	76,3b	455.106,7a	151,7a
FX 17	8,6	11,1	58,7b	419.883,3a	139,9a
FX 18	8,4	9,1	143,0a	362.330,0a	120,8a
FX 19	8,8	10,6	126,0a	316.330,0a	105,4a
FX 20	7,2	9,8	77,3b	462.330,0a	154,1a
FX 21	6,6	7,9	52,3b	360.330,0a	120,1a
CV (%)	23,88	29,93	27,01	29,66	21,43

\*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knot a 5% de probabilidade; TEST- testemunha onde as ementas de arroz forma microbiolizadas com água salina; XT- xisto camada superior 0-20cm profundidade do solo; XTI- xisto camada inferior 20-50cm profundidade do solo, CX- calcisto (calcário de xisto); FX- finos de xisto; CV- coeficiente de variação; ns- Não significativo.



## ANEXOS

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).

