

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-graduação em Fitossanidade



Dissertação

**Potencial de bactérias na promoção de crescimento e biocontrole
de fitonematoides em cana-de-açúcar**

Cielo Pamela Machaca Calsin

Pelotas, 2021

Cielo Pamela Machaca Calsin

**Potencial de bactérias na promoção de crescimento e biocontrole de
fitonematoides em cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (Área do Conhecimento: Fitopatologia).

Orientador: Dr. Cesar Bauer Gomes
Coorientadora: Dr^a. Andrea Bittencourt Moura

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C141p Calsin, Cielo Pamela Machaca

Potencial de bactérias na promoção de crescimento e biocontrole de fitonematoides em cana-de-açúcar / Cielo Pamela Machaca Calsin ; Cesar Bauer Gomes, orientador ; Andrea Bittencourt Moura, coorientadora. – Pelotas, 2021.

85 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Biocontrole. 2. Rizobactérias. 3. Fitonematoides. 4. Cana-de-açúcar. 5. Promoção de crescimento. I. Gomes, Cesar Bauer, orient. II. Moura, Andrea Bittencourt, coorient. III. Título.

CDD : 595.7

Potencial de bactérias na promoção de crescimento e biocontrole de
fitonematoides em cana-de-açúcar

Data da defesa:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Bauer Gomes (Embrapa Clima Temperado) - Orientador

Prof.^a Dr.^a Andrea Bittencourt Moura (PPGFS/FAEM-UFPel)

Prof. Dr. Jerônimo Vieira de Araújo Filho (PPGFS/FAEM-UFPel)

Prof.^a Dr.^a Claudia Regina Dias-Arieira (PGA/Universidade Estadual de Maringá)

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por me dar saúde, força e coragem para enfrentar novos desafios

Agradeço, a meus pais Diodora Calsin e Roger Machaca, e meus irmãos Rony, Shane e Mark pelo seu amor infinito e apoio constante.

Agradeço a meu orientador Dr. Cesar Bauer Gomes, por ter acreditado em mim, pela orientação, paciência, confiança, ensinamentos de dia a dia, para concluir este trabalho e sobretudo por me ensinar que tudo é possível e não soltar minha mão.

Agradeço a minha coorientadora Dr^a. Andrea Bittencourt Moura pelos seus ensinamentos brindados para a concertação deste trabalho.

Aos funcionários de Embrapa Clima Temperado Gelson Krolow, Léster Amorim Pinheiro, Luciane Da Rocha Alves, Renê Pereira e Fabiane Grecco Da Silva Porto pelas dicas e ajuda prestada.

Ao pesquisador Sérgio Delmar Dos Anjos e Silva pelos ensinamentos e disponibilidade de material para concretização deste trabalho.

Ao pesquisador Jorge Schafhäuser Junior pela disponibilidade do laboratório.

Ao pesquisador Bernardo Ueno pela ajuda sempre inegável e dicas durante a execução do trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Fitopatologia Embrapa Clima Temperado Wellington da Silva Rodrigues, Giliard Correia, Helena Oxley, Patrícia Grinberg, Alejandro Yanez, Sabrina Martins, João Gabriel Göebel e Diego pelas boas risadas, conselhos, pelas palavras de encorajamento em tempos difíceis.

Aos meus amigos e pesquisadores Cristiano Bellé, Ismail Teodoro de Souza Júnior, Victor Hugo Casa e Israel Lima pelo carinho e dicas para desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Dona Vania da Silva Grinberg, Patrícia Grinberg, David Bendayan e Wellington da Silva Rodrigues por me aceitar e ajudar o tempo todo. Definitivamente, vocês são pessoas carregadas no coração para o resto da vida. Muito obrigada.

Resumo

Machaca, Cielo Pamela Calsin. **Potencial de bactérias na promoção de crescimento e biocontrole de fitonematoides em cana-de-açúcar.** 2021. 85f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Entre os problemas que afetam a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) no Brasil, os fitonematoides são responsáveis por limitar o desenvolvimento das plantas e a produtividade da cultura. Nesse sentido, medidas de manejo desses patógenos são necessárias para reduzir os prejuízos e, preservar o equilíbrio biológico do solo e do meio ambiente. Dessa forma, foram objetivos deste estudo: 1) avaliar o potencial da microbiolização de mudas de cana-de-açúcar com cinco isolados de rizobactérias (XT21-*Arthrobacter pascens*, XT23-*Micrococcus luteus*, XT38-*Exiguobacterium acetylum*, XT39-*Micrococcus luteus* e XT56-*Bacillus megaterium*) no biocontrole do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne javanica*), das lesões (*Pratylenchus zeae*) e espirado (*Helicotylenchus dihystera*), seus efeitos sobre o desenvolvimento de plantas, qualidade dos colmos e produtividade em cana-planta e cana-soca a campo; 2) prospectar o efeito nematicida *in vitro* dos isolados bacterianos sobre *P. zeae*; e, caracterizar tais isolados quanto à capacidade de biocontrole e promoção de crescimento; e, 3) avaliar o desenvolvimento de mudas de diferentes cultivares de cana microbiolizadas com os isolados XT23, XT38 e XT39 sob duas formas de irrigação. Verificou-se que o tratamento das mudas com todos isolados resultou em supressão >70% de *M. javanica*, e 45% de *P. zeae* com XT39 em cana-planta. Já em cana-soca, verificou-se os maiores níveis de controle de *M. javanica* >40% nas raízes com os isolados XT23, XT38 e XT39 e, redução de 80% no solo, independentemente do isolado. Para *P. zeae*, embora todos isolados tenham controlado o nematoide no solo e ou nas raízes, o tratamento com XT38 e XT56 resultou em níveis de controle >40%; e para *H. dihystera*, observou-se supressão acima de 60% principalmente nas raízes da cana com XT23, XT38 e XT56. Aos 210 e 240 dias após a microbiolização da cana-planta e reaplicação das bactérias em cana-soca, no tratamento com o isolado XT38 verificou-se valores de °Brix mais elevados nos colmos; que somado aos tratamentos com XT23 e XT39 também resultaram em aumento dos níveis de clorofila. Embora algum incremento dos SST no caldo da cana tenha sido observado apenas em cana-soca, 18 mil litros de caldo a mais foram produzidos com XT21 e XT23 em cana-soca. Aumento significativo da massa de colmos foi obtido com XT21 em ambas as colheitas; e, com XT38 e XT23, em cana-planta e cana-soca, respectivamente. Na avaliação de açúcares redutores, menores níveis de glicose foram observados com o isolado XT21 em cana-planta e com os demais isolados em cana-soca. Por outro lado, valores menores de celulose e de fibra bruta nos colmos, foram observados de forma mais consistente no tratamento das mudas com XT38. Os isolados XT21 e XT38 produziram o maior número de compostos relacionados ao biocontrole de nematoides e promoção de crescimento de plantas, sendo o primeiro associado à produção de proteases, amônio e ácido cianídrico; e, o segundo, à produção auxina e fosfatase. Na avaliação da produção de mudas de cana-de-açúcar, a microbiolização com XT23 e XT38 foi efetiva quanto ao incremento da massa fresca da parte aérea e das raízes, porém, efeitos negativos foram observados e podem estrar relacionados a cultivar e ao sistema de irrigação adotado.

Palavras-chave: Biocontrole, rizobactérias, fitonematoides, cana-de-açúcar, promoção de crescimento.

Abstract

Machaca, Cielo Pamela Calsin. **Potential of bacteria on growth promotion and biocontrol of plant parasitic nematodes in sugarcane.** 2021. 85f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Among the problems affecting sugarcane (*Saccharum* spp.) in Brazil, the plant parasitic nematodes are responsible for limiting the plant development and crop productivity. In this sense, management measures for these pathogens are necessary to reduce damage and preserve the biological balance of the soil and the environment. In this sense, the objectives of this study were: 1) to evaluate the potential of microbiolization of sugarcane seedlings with five rhizobacteria isolates (XT21-*Arthrobacter pascens*, XT23-*Micrococcus luteus*, XT38-*Exiguobacterium acetylum*, XT39-*Micrococcus luteus* e XT56-*Bacillus megaterium*) in the biocontrol of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) root-lesion (*Pratylenchus zaeae*) and spiral nematode (*Helicotylenchus dihystera*), plant development, stalk quality and sugarcane yield in the plant-cane and ratoon under field conditions; 2) to prospect the *in vitro* nematicidal activity of bacterial isolates on *P. zaeae*; and, characterize these isolates for their ability to biocontrol and plant promoting growth; and, 3) to evaluate the development of seedlings of different sugarcane cultivars by microbiolization with isolates XT23, XT38 and XT39 under two irrigation forms. The treatment of seedlings with all isolates resulted in >70% suppression of *M. javanica* and 45% of *P. zaeae* with XT39 isolate in plant-cane. In ratoon-cane, the highest levels of control of *M. javanica* were >40% in the roots with the isolates XT23, XT38 and XT39, and a reduction of 80% in the soil, regardless of the isolate. For *P. zaeae*, although all isolates controlled the nematode in the soil and/or roots, the treatments with XT38 and XT56 resulted in control levels >40%; and for *H. dihystera*, suppression above 60% was observed, mainly in the sugarcane roots with XT23, XT38 and XT56 isolates. At 210 and 240 days after microbiolization (plant-cane) and second application (ratoon-cane) bacteria, the XT38 rhizobacteria using resulted in higher °Brix in the stalks besides has resulted a chlorophyll levels increasing together XT23 and XT39 rizhobacteria treatments. Although some TSS increase occurred only in the ratoon-cane juice, an additional 18 thousand liters of sugarcane juice were produced with XT21 and XT23 in ratoon-cane. A significant increase of stalk mass was obtained using XT21 isolate in both harvests; and, with XT38 and XT23 in plant and ratoon-cane, respectively. About reducing sugars evaluations, lower glucose levels were observed with XT21 in plant-cane and with the other isolates in ratoon-cane. On the other hand, lower percentage values of cellulose and crude fiber in the stalks were observed in the treatment of seedlings with XT38. The XT21 and XT38 isolates produced the highest number of compounds related to biocontrol and plant growth promotion, the first being associated with the production of proteases, ammonium, hydrocyanic acid and auxin; and, the second, to proteases, hydrocyanic acid and phosphatase production. Evaluating the production of sugarcane seedlings, the microbiolization with XT23 and XT38 rizhobacteria was effective in increasing the fresh mass of shoots and roots, however, negative effects were observed and it may be related to the cultivar and the system of irrigation adopted.

Keywords: Biocontrol, rhizobacteria, plant parasitic nematodes, sugarcane, growth promotion.

Lista de figuras

- Figura 1- Dados mensais de precipitação pluviométrica, temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa do ar, Pelotas, RS-201957
- Figura 2- Dados mensais de precipitação pluviométrica, temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa do ar, Pelotas, RS-202057

Lista de tabelas

Tabela 1. Identificação/código dos isolados bacterianos empregados na microbiolização	23
Tabela 2. Atividade biocontroladora de de cinco isolados bacterianos no manejo do nematoide-das-galhas, das lesões e espirados em cana-planta.	32
Tabela 3. Efeito de diferente tratamento bacterianos sobre o índice de clorofila total e número de perfilhos em plantas de cana-de-açúcar microbiolizadas com cinco isolados bacterianos aos 210, 240, 270 e 300 após o transplante (cana-planta).....	33
Tabela 4. Efeito de diferentes tratamentos bacterianos sobre o conteúdo de sólidos solúveis totais (°Brix) no terço inferior e superior dos colmos de cana-planta, e, a média, aos 240 e 270 dias após o transplante das mudas para o campo(cana-planta).....	34
Tabela 5. Efeito de cinco rizobactérias sobre o diâmetro do colmo/planta (DC), número de colmo/planta (NCP), número de colmos/parcela, (NCP), número de colmos/ha (NCPH), massa fresca dos colmos/planta (MFCP), teor de sólidos solúveis totais (°Brix) do caldo (BDC), massa fresca dos colmos/planta (MFCP), massa fresca dos colmos/parcela (MFCPP), massa fresca de colmos/hectare (MFCH), volume do caldo/planta (VCP) e volume de caldo/ha (VCH) em cana-planta na colheita (330 DAT/cana-planta).....	36
Tabela 6. Efeito de cinco rizobactérias sobre os teores de hemicelulose (HEMI), celulose (CEL), lignina (LIG), de fibra bruta em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA), e, conteúdo de glicose e sacarose em plantas de cana-de-açúcar aos 330 dias após a microbiolização das mudas (cana-planta).....	37
Tabela 1. Atividade biocontroladora de rizobactérias no manejo do nematoide-das-galhas, das lesões e espirados em cana-soca aos 330 após a segunda aplicação (no solo)	39
Tabela 8 . Efeito de diferente tratamento bacterianos sobre o índice de clorofila total e número de perfilhos em plantas de cana-de-açúcar microbiolizadas com cinco isolados bacterianos aos 210, 240, 270 e 300 da segunda aplicação em cana-soca.....	41

Tabela 9. Efeito de diferentes tratamentos bacterianos sobre o conteúdo de sólidos solúveis totais (°Brix) no terço inferior, superior e média dos colmos de cana-soca após 240 e 270 dias após o transplante das mudas para o campo. ...	42
Tabela 10. Influência de cinco rizobactérias sobre o diâmetro do colmo (DC), número de colmo/planta (NCP), número de colmos/parcela, (NCP), número de colmos/ha (NCPH), massa fresca dos colmos/planta (MFCP), teor de sólidos solúveis totais (°Brix) do caldo (BDC), massa fresca dos colmos/planta (MFCP), massa fresca dos colmos/parcela (MFCPP), massa fresca de colmos/hectare (MFCH), volume do caldo/planta (VCP) e volume de caldo/ha (VCH) em cana-soca na colheita (330 dias após a 2ª aplicação)	44
Tabela 11. Influência de cinco rizobactérias sobre os teores de hemicelulose (HEMI), celulose (CEL), lignina (LIG), de fibra bruta em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA), e, conteúdo de glicose e sacarose produzidos por plantas de cana-de-açúcar, 330 dias após a segunda aplicação (solo) em cana-soca	44
Tabela 12. Percentagem da mortalidade <i>in vitro</i> de espécimes de <i>Pratylenchus zeae</i> 24h após o tratamento com os isolados bacterianos XT21, XT56, XT23, XT39 e XT38.....	45
Tabela 13. Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos XT21, XT23, XT38, XT39 e XT56 quanto à capacidade de biocontrole.....	45
Tabela 14. Caracterização bioquímica de isolados bacterianos XT21, XT23, XT38, XT39 e XT56 quanto à capacidade de produção de compostos relacionados à promoção de crescimento de plantas.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 15. Potencial de três isolados de rizobactérias quanto a capacidade de promoção de crescimento em mudas de quatro variedades de cana-de-açúcar conforme conteúdo de clorofila total, massa da parte aérea das raízes sob sistema <i>floating</i>	58
Tabela 16- Diâmetro do colo e à altura em mudas de quatro variedades de cana-de-açúcar em sistema <i>floating</i> independentemente do isolado bacteriano testado.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 17 - Altura, clorofila total, e, massa fresca da parte aérea e das raízes em mudas de diferentes variedades de cana-de-açúcar microbiolizadas com três isolados bacterianos submetidas a irrigação por regas diárias (substrato não saturado).....	62

Tabela 18- Diâmetro do colo de mudas de diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas a irrigação por regas diárias (substrato não saturado) independentemente dos tratamentos com isolados bacterianos.....61

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. CAPÍTULO 1: Avaliação do potencial de isolados bacteriano no biocontrole de fitonematoides e sua influência sobre parâmetros relacionados ao desenvolvimento, produtividade e qualidade de cana-de-açúcar.....	17
2.1 Introdução	17
2.2 Material e Métodos.....	20
2.2.1 Biocontrole de fitonematoides e características agronômicas e químico-bromatológicas em genótipo de cana RB008347 microbiolizado com cinco rizobactérias em condições de campo	20
2.2.2 Obtenção, manutenção e caracterização molecular dos isolados rizobacterianos.....	22
2.2.3 Avaliação do emprego mudas de cana-de-açúcar microbiolizadas com rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento das plantas em condições de campo (cana-planta)	24
2.2.4 Potencial de aplicação de rizobactérias em plantas de cana-soca no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento e produtividade da cultura em condições de campo	25
2.3 Efeito nematicida dos isolados bacterianos sobre <i>Pratylenchus zae</i>.....	29
2.4 Caracterização dos isolados bacterianos quanto a capacidade de biocontrole de fitonematoides e promoção de crescimento de plantas	30
2.4.1 Avaliação dos isolados bacterianos quanto a capacidade de biocontrole	30
2.4.2 Avaliação dos isolados bacterianos quanto a capacidade de promoção de crescimento de plantas.....	31
2.5 Resultados e discussão	32
2.5.1 Avaliação do potencial de rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e características agronômicas e químico-bromatológicas em genótipo de cana RB008347 microbiolizado com cinco rizobactérias em condições de campo.....	32
2.5.1.1 Identificação e caracterização das espécies de <i>Meloidogyne</i> , <i>Pratylenchus</i> e <i>Helicotylenchus</i>	32
2.5.1.2 Caracterização molecular do isolado bacteriano XT56	32

2.5.1.3 Efeito da microbiolização de mudas de cana-de-açúcar com rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento em cana-planta sob condições de campo	32
2.5.3.1.4 Efeito da microbiolização de mudas de cana-de-açúcar com rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento em cana-soca sob condições de campo	39
2.5.3.1.5 Avaliação do efeito nematicida dos isolados bacterianos sobre <i>Pratylenchus zae</i>	45
2.6 Caracterização dos isolados bacterianos quanto a capacidade de biocontrole de fitonematoides e promoção de crescimento de plantas	46
2.7 Análise conjunta dos resultados	47
2.8 Conclusões.....	52
3. CAPITULO 2: POTENCIAL DE RIZOBACTERIAS NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR	53
3.1 Introdução.....	53
3.2 Material e métodos	55
3.3 Resultados e Discussão	58
3.3.1 Avaliação dos isolados bacterianos no desenvolvimento de mudas de pré-brotadas de cana-de-açúcar em sistema <i>floating</i>	58
3.4 Conclusões.....	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE A	81
APÊNDICE B	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L. Híbrido) é uma planta monocotiledônea, alógama, pertencente ao gênero *Saccharum* L. e à família Poaceae e tribo Andropogone a qual engloba culturas como o sorgo e o milho de importância na alimentação humana (BACCHI,1983; DANIELS; ROACH 1987; SREENIVASAN; AHLOOWALIA; HEINZ, 1987). Esta espécie vegetal, de origem provável da Nova Guiné, foi introduzida no Brasil durante a época colonial convertendo-se em uma cultura economicamente importante, o que tem fomentado a expansão do agronegócio nacional (PRADO JUNIOR,1970; HOLANDA,1995; CESNIK; MIOCQUE, 2004). Registrando-se anualmente uma produção de 749.977.852,5 toneladas destinadas para a fabricação de etanol (anidro e hidratado) e açúcar, sendo a região Centro sul o maior produtor com 7.707,5 mil ha cultivados com uma produção média de 610.655,2 mil T, seguido das regiões Sudeste, Nordeste/Norte e Sul as quais ocupando 5.362,8. 897,5 e 517,3 mil hectares com produtividades de 436.420,0, 54.449,8 e 34.475,7 T, respectivamente, (CONAB, 2020; 2021).

Embora a produção na região Sul seja menor em comparação à produção nacional, a cultura tem sido importante por estar associada às atividades relacionadas ao fortalecimento da agricultura familiar, através do desenvolvimento econômico e social (ROSA et al., 2016) utilizando-se a cana-de-açúcar como matéria prima para a fabricação artesanal de açúcar mascavo, cachaça (aguardente), melado e rapadura (ANJOS; SILVA, 2016). No entanto, nos últimos anos, a cultura de cana-de-açúcar vem tomando importância significativa na alimentação de bovinos, por ser uma alternativa forrageira de melhor desempenho durante períodos longos de déficit hídrico, sendo utilizada de forma fresca (*in natura*) e silagem (ANJOS; SILVA, 2016; BELLÉ, 2014).

Porém, a cana-de-açúcar no Brasil, enfrenta diversos fatores limitantes, destacando-se: as condições edafoclimáticas como falta ou excesso de chuvas, temperaturas extremas, baixa radiação, assim como problemas fitossanitários os quais dificultam a manutenção de um nível elevado de produção e produtividade (MOURA; MACEDO, 1997; MOURA; SILVA; LIMA, 2000; SMIT; SINGELS, 2006; McCORMICK; CRAMER; WATT, 2008; VAN HEERDEN; EGGLESTON; DONALDSON, 2010).

Entre os problemas fitossanitários associados à baixa produtividade da cana-de-açúcar, doenças causadas pelos nematoides têm sido responsáveis por danos

consideráveis na cultura, cujas perdas no rendimento são estimadas em um 20% (DINARDO-MIRANDA; GIL; MENEGATTI, 2003). Reportando-se, aproximadamente 317 espécies associadas a 48 gêneros de fitonematoides endoparasitos e ectoparasitos entre os quais se encontram os gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Radopholus*, *Paratrichodorus*, *Trichodorus*, *Xiphinema*, *Aphelenchoides*, *Mesocriconema*, *Hemicycliophora*, *Longidorus*, *Rotylenchus* e *Tylenchorhynchus* (LAMBERTI et al.,1987; BLAIR et al.,1999; CADET; SPAULL, 2005; BERRY et al., 2008; BELLÉ, 2014; BELLÉ et al., 2014, 2017; KAWANOBE et al.,2016, 2019)

Dentre as espécies endoparasitas amplamente disseminadas nas plantações de cana-de-açúcar no Brasil, destacam-se a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *Pratylenchus zae* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven e *P. brachyurus* Graham (RODRIGUES et al., 2011; MATTOS et al., 2011; BELLÉ, 2018) cuja ocorrência dá-se de forma mista, prevalecendo uma espécie frente às outras, dependendo das condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento (CHAVES; PEDROSA; MELO, 2004). Não obstante, um segundo grupo de nematoides ectoparasitas pertencentes ao gênero *Helicotylenchus* vem sendo expostas em altas densidades populacionais, na maioria das plantações canavieiras e em muitos casos se encontram relacionados ao declínio das plantas destacando-se a espécie *Helicotylenchus dihystra* (Cobb) Sher (SILVA et al., 2016 SEVERINO; DIAS-ARIEIRA; TESSMANN, 2010; BELLÉ et al., 2014; MARANHÃO et al., 2018).

Apesar da diversidade de espécies encontradas *M. javanica* e *P. zae* são descritos como as espécies mais predominantes em canaviais dos estados do Paraná e do Rio Grande do Sul (SEVERINO et al., 2008; BELLÉ, 2018; BELLÉ et al., 2014; BELLÉ et al., 2017; BISOGNIN, 2017) ocasionando danos significativos na produtividade e desenvolvimento da cultura (BARROS et al., 2005; INOMOTO,2016; DINARDO-MIRANDA, 2014; BELLÉ, 2018).

Entre as formas de manejo, o uso de material genético é o mais recomendado (BARROS, 2000), no entanto a carência de material resistente no mercado (PEDROSA; MOURA; SILVA, 2000), tem promovido a adoção de diversas estratégias de manejo, como a aplicação de adubos verdes, uso de matéria orgânica, rotação de cultivos, uso de produtos químicos e biológicos (DINARDO-MIRANDA, 2014). Destacando-se o emprego de nematicidas químicos e microbiológicos, por reduzir o

número populacional de fitonematoides (DINARDO-MIRANDA, 2014). Na atualidade existem 15 produtos químicos registrados pelo MAPA cujos ingredientes ativos são cadusafós, terbufós, tiodicarbe, fluensulfona, fluazaindolizina e carbossulfano. Adicionalmente, mais de 30 produtos biológicos são registrados no controle dessas pragas (AGROFIT, 2021), dos quais apenas dois são recomendados para a cultura, sendo esses à base de *Purpureocillium lilacinum* Thom (*Paecilomyces lilacinus*), *Bacillus subtilis* Eherenberg (Cohn) e *Bacillus licheniformis* (Weigmann) Chester.

O uso de organismos benéficos associadas ao controle biológico é considerado como uma estratégia segura e prática reduzindo os efeitos negativos causados pelos nematoides, além de promover respostas positivas através da colonização do sistema radicular das plantas (JUNAID et al., 2013; TIMPER, 2014).

Dentre os agentes de controle biológico de fitonematoides, as rizobactérias são consideradas uns dos organismos antagonistas mais eficientes (SIKORA, 1988) por apresentarem uma serie de mecanismos de parasitismo do patógeno alvo os quais incluem desde a produção de metabólitos extracelulares de ação nematicida como cianeto de hidrogênio, antibióticos, enzimas hidrolíticas até a resistência sistêmica induzida, interferindo na reprodução, postura e eclosão de ovos dos nematoides, assim também, na sobrevivência dos estádios iniciais e desenvolvimento de indivíduos adultos (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999). Além de atuar direta e positivamente no desenvolvimento da planta, influenciando a fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, produção fitormônios e sideróforos, assim como também a mineralização de matéria orgânica (ROMEIRO, 2007; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

Por outro lado, a ação nematicida por bactérias tem sido demonstrada em muitos estudos (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999; HUANG; TAO; CHEN, 2005; PADGHAM; SIKORA, 2007). Conforme, Berini et al., (2018) vários gêneros são conhecidos por serem utilizados no controle biológico, destacando-se entre eles o gênero *Pasteuria* spp., e as rizobactérias *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. Entre as últimas, o bionematicida Quartzo, à base de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, com registro para a cultura (AGROFIT, 2021), tem evidenciado bons resultados quanto à diminuição da densidade populacional de *P. zae* e o aumento de produtividade agrícola, em plantações de cana do Nordeste infestadas por este fitonematoide, porém não foi relatado o efeito de tal produto sobre o nematoide-das-galhas (CHAVES, 2018). Além disso, a maioria dos trabalhos refere-se aos estudos *in vitro* os quais, muitas vezes,

não se confirmam em condições de campo em razão de terem sido usados agentes provenientes de nichos ecológicos diferentes e que não se adaptam à nova condição da nova cultura.

Em trabalhos recentes, avaliou-se o potencial de diferentes isolados bacterianos, quanto à colonização *in vitro* de cana-de-açúcar, promoção de crescimento de mudas, desenvolvimento de plantas e biocontrole de *M. javanica* (BISOGNIN, 2017) e de *P. zea* (HELLER et al., 2018) em casa de vegetação. Nesses estudos, verificou-se que pelo menos quatro desses isolados, demonstraram potencial de biocontrole (40-85%) das referidas pragas, melhor desempenho no desenvolvimento das mudas e ganho de massa da parte aérea e das raízes das plantas microbiolizadas. No entanto, estudos quanto à capacidade desses isolados promoverem o crescimento das plantas e controlarem além do nematoide-das-galhas e das lesões, outros nematoide, em condições de campo, não foram conduzidos.

Dessa forma, teve-se por objetivo no presente estudo, avaliar o potencial de cinco isolados bacterianos testados e selecionados por Bisognin (2017) no biocontrole de *M. javanica*, *P. zea* e *H. dihystra*, e, seus efeitos no desenvolvimento de plantas, qualidade dos colmos e produtividade de cana-de-açúcar em mudas previamente microbiolizadas, sob condições de campo; b) avaliar o efeito nematicida dos isolados bacterianos sobre *P. zea*; e, caracterizar tais rizobactérias quanto a capacidade de biocontrole de fitonematoídeos e promoção de crescimento de plantas; e, c) avaliar a eficiência de diferentes isolados bacterianos na microbiolização e produção de mudas de quatro diferentes variedades sob diferentes formas de irrigação.

2 CAPITULO 1: Avaliação do potencial de isolados bacteriano no biocontrole de fitonematoides e sua influência sobre parâmetros relacionados ao desenvolvimento, produtividade e qualidade de cana-de-açúcar

2.1 Introdução

Entre os anos 2009 e 2019, o setor canavieiro apresentou uma expansão do 14,3% permitindo satisfazer a demanda dos mercados a nível nacional e mundial. Através do fornecimento de matéria prima para a fabricação de diversos produtos como o açúcar e bioetanol (ANJOS et al.,2008), além de impulsionar a revolução de desenvolvimento tecnológico produção de energia sustentável, mitigando o aquecimento global e as mudanças climáticas (UNICA, 2020; UDOP, 2021). No entanto, mesmo com o crescimento das áreas plantadas, o desenvolvimento da cultura vem sofrendo reduções em quanto à produção, por estar sujeita ao ataque de inumeráveis doenças, dentre os quais destaca-se as nematoses, encontrando-se em aproximadamente em mais de 70% das áreas de cultivo de cana-de-açúcar no país (SIAMIG, 2017).

Os fitonematoides são fitoparasitas comumente presentes no agroecossistema da cultura de cana-de-açúcar. Tais patógenos apresentam alto potencial destrutivo por parasitar o sistema radicular das plantas atacadas que, por sua vez, afetam drasticamente a absorção e a translocação de nutrientes, alterando a fisiologia e nutrição da cultura. No Brasil, espécies como *Pratylenchus zaeae*, *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (DINARDO-MIRANDA et al., 2014) são considerados as mais comuns nos canaviais brasileiros onde elevadas populações podem afetar a produtividade (BARROS et al., 2005). Não obstante, na região sul do país, *P. zaeae* e *M. javanica* são as espécies mais comuns (BELLÉ, 2014; BISOGNIN, 2017).

Os sintomas decorrentes do parasitismo de espécies de *Meloidogyne* em cana-de-açúcar são a formação de galhas e o engrossamento da ponta das raízes, originados após da penetração do juvenil segundo estágio (J2) onde barreiras de defesas são superadas através do estilete, atravessando assim o parênquima cortical posicionando-se finalmente na periferia do cilindro central, estabelecendo o sitio de alimentação, e, assim, induzindo à formação de tecido nutridor, provocando hiperplasia local e hipertrofia das células caracterizada pela formação de galhas (FERRAZ; BROWN, 2016; HAEGEMAN et al., 2012; MITCHUM et al., 2013).

Como consequência da infecção, as raízes aumentam de diâmetro impossibilitando o desempenho normal de suas funções (VALLE-LAMBOY; AYALA, 1980). Adicionalmente, em trabalho recente conduzido por Bellé (2018), verificou-se que plantas de cana infectadas com *M. javanica* apresentaram aumentos nos níveis de celulose, hemicelulose, lignina e fibra bruta, que pode interferir negativamente nos índices de digestibilidade quando a cana é utilizada na alimentação animal. Neste mesmo estudo, o autor observou redução dos valores de graus °Brix do caldo e aumento de açúcares redutores nos colmos das plantas parasitadas pelo nematoide-das-galhas, o que pode afetar tanto a qualidade do álcool como do açúcar produzido.

Pratylenchus zae é a espécie mais comumente encontrada nos canaviais do país (GOMES; NOVARETTI, 1985) sendo essa praga responsável por ocasionar lesões conspícuas de coloração púrpura-vermelhas ou marrons nas raízes das plantas de cana parasitadas (STIRLING; BLAIR, 2000). As infecções por estes nematoides, no geral, se restringem ao parênquima cortical, causando destruição das células pela ação mecânica ocasionada durante a movimentação e alimentação do patógeno, o que provoca o rompimento das paredes celulares, formando-se tuneis no córtex das raízes. Assim, tais alterações resultam no enfraquecimento da touceira nos canaviais, os quais em infecções severas, podem estar associados a uma redução massa da parte aérea e das raízes parasitadas, amarelecimento das folhas, e redução do comprimento (VALLE-LAMBOY; AYALA, 1980) e número de colmos (BLAIR et al., 1999). Já para os nematoides espiralados, há pouca informação quanto a patogenicidade e danos em cana-de-açúcar em nossas condições. Embora existam evidências de danos na cultura associados a *H. dihystra* (STARR; BENDEZU, 2002), em estudos conduzidos por Cadet (1986) na África do Sul, o autor verificou incremento na produção com o aumento da população desse patógeno na cultura atribuindo baixa virulência a essa espécie.

Entre as práticas de manejo o uso de nematicidas químicos (AGROFIT, 2021) é a estratégia mais utilizada em canaviais com problemas nematológicos no País (CHAVES, A. informação pessoal). No entanto, o efeito desses produtos no controle de nematoides é efêmero; e com um tempo limitado de aproximadamente 90 dias contados após a aplicação, gerando sujeição de aplicações frequentes nas áreas infestadas (MOURA; MACEDO, 1997). Desta forma, uma opção promissora é o emprego do controle biológico, o qual consiste na utilização de micro-organismos benéficos como as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP).

Esses micro-organismos são bactérias que exibem a capacidade de promover o crescimento de plantas além de proporcionar sua bioproteção contra patógenos através de um ou vários mecanismos (RESÉNDEZ et al., 2018) como a liberação de toxinas (nematicidas ou nemastáticos) ou enzimas hidrolíticas como lipases, proteases e quitnases que podem prevenir a eclosão de ovos e ou o desenvolvimento e reprodução dos nematoides (SUBEDI et al., 2020).

Além de atuar como bioestimulantes eficazes, favorecendo o crescimento e a produtividade das plantas e como consequência melhoraram a tolerância das plantas a diversos fatores bióticos (patógenos microbianos e insetos herbívoros) e abióticos (salinidade, tolerância a temperaturas extremas e variações no pH), (DE VRIEZE, 2015). Assim várias espécies vinculadas à rizosfera vêm sendo relatadas como agentes potenciais de controle biológico para fitonematoides (RADWAN et al., 2012; MACHADO et al., 2012), distinguindo-se *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus* Bredemann and Werner, *B. methylotrophicus* Madhaiyan e *Pasteuria nishizawae* Sayre (MAPA, 2019). Para exemplificar, Mazzuchelli; Mazzuchelli; Araújo, (2020) avaliando a aplicação de *B. subtilis* no controle dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* em dois genótipos de cana-de-açúcar (RB867515 e SP81-3250) em comparação a um tratamento nematicida convencional, observaram que *B. subtilis* proporcionou controle efetivo dos nematoides.

Alguns estudos no Brasil têm evidenciado a importância de um grupo de bactérias diazotróficas, tais como *Burkholderia*, *Sphingobium*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Nitrospirillum* e *Paraburkholderia*, na melhoria do estabelecimento inicial das plantas no campo, o que leva a uma melhor absorção de água e nutrientes, influenciando positivamente nos teores finais de açúcar nos colmos e produtividade (REIS et al., 2004; MATOSO et al., 2016; SCHULTZ et al., 2016). Porém, essas bactérias não apresentam efeito conhecido na supressão de fitonematoides.

Apesar do registro no MAPA do bionematicida Quartzo (AGROFIT, 2021) à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* para o manejo de *P. zea* (CHAVES, 2018) e *Meloidogyne* spp., não há relatos no biocontrole do nematoide-das-galhas em cana-de-açúcar com este produto biológico. Há mais de 10 anos, um grupo de rizobactérias foram selecionadas na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas-RS, quanto à promoção de crescimento e biocontrole de *M. graminicola* Golden & Birchfield em arroz irrigado (BRUM, 2017) e com ação no biocontrole *M. javanica* em

azevém (GOEBEL et al., 2019) e de *M. javanica* (BISOGNIN, 2017) e *P. zea* (HELLER et al, 2018) em cana-de-açúcar, sob condições de casa de vegetação. No entanto, essas bactérias não foram avaliadas quanto a sua eficiência no controle de *P. zea* e *M. javanica* em condições de campo.

Nesse sentido, foram objetivos desse trabalho: a) avaliar a eficiência de cinco isolados bacterianos selecionados em mudas de cana previamente microbiolizadas no biocontrole do nematoide-das-galhas (*M. javanica*), das lesões (*P. zea*) e espirado (*H. dihystra*), e, seus efeitos sobre o desenvolvimento, qualidade e produtividade da cultura em cana-planta e cana-soca; b) investigar a influência dos tratamentos bacterianos sobre os componentes da parede celular, digestibilidade de fibras e teores de açúcares (redutores/não redutores) dos colmos em cana-planta e cana-soca; e, c) avaliar o efeito nematicida bem como a capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole de fitonematoides e de promoção de crescimento de plantas, destes isolados, em estudos *in vitro*.

2.2 Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido na área experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado em Pelotas-RS (31°40'16"S e 52°26' 28"O). As atividades de casa-de-vegetação e de campo foram desenvolvidas no período de janeiro 2018 a outubro de 2020, efetuando as avaliações nos Laboratórios de Fitopatologia/Nematologia, Fisiologia Vegetal e Bromatologia e Nutrição animal da mesma instituição, bem como no laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, em Capão do Leão-RS.

2.2.1 Biocontrole de fitonematoides e características agrônômicas e químico-bromatológicas em genótipo de cana RB008347 microbiolizado com cinco rizobactérias em condições de campo

2.2.1.1 Coletas, extração, identificação e quantificação dos fitonematoides para determinação das populações iniciais

O experimento foi instalado em uma área anteriormente cultivada com cana e naturalmente infestada com o nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* sp.), das lesões

(*Pratylenchus* sp.) e espiralado (*Helicotylenchus* sp.). Primeiramente a área foi arada e gradeada para estabelecimento das parcelas (linhas) em delineamento em blocos ao acaso com cinco repetições (parcelas) de 5,6m²/tratamento contendo oito mudas com espaçamento de 0,5m entre plantas e 0,7m entre linhas.

Após o estabelecimento das parcelas, procedeu-se a coleta de amostras de solo conforme Tihohod (1993) para determinação das populações iniciais (PI). Para tanto, em cada parcela foram coletadas 10 subamostras na profundidade de 0-20cm (NORTON; NIBLACK, 1991), as quais foram devidamente homogeneizadas obtendo-se uma amostra composta de aproximadamente 1Kg. Em seguida cada amostra foi adequadamente embalada, identificada e transportada ao laboratório de Fitopatologia/Nematologia para a identificação e avaliação da densidade populacional dos nematoides.

Para determinação das populações iniciais dos nematoides, em laboratório, uma alíquota de 250 cm³ de cada amostra foi processada através da metodologia de peneiramento e centrifugação em solução sacarose (JENKINS,1964), sendo a suspensão obtida, avaliada sob microscópio estereoscópico. A seguir, a suspensão de cada amostra foi identificada e quantificada quanto a população inicial dos nematoides (nematoides/250 cm³) dos gêneros *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. e *Helicotylenchus* spp. presentes conforme a chave de Mai e Mullin (1996). Adicionalmente, para o gênero *Meloidogyne*, foram conduzidos biotestes com o solo de cada parcela em vasos de 250cm³ de solo onde foi plantado um muda de tomateiro suscetível Santa Cruz. Decorridos 50 dias do plantio, as plantas foram avaliadas quanto ao número de galhas nas raízes para estimativa da densidade populacional.

2.2.1.1.1 Caracterização bioquímica das espécies de *Meloidogyne*

A partir dos biotestes, as plantas de tomate com galhas foram utilizadas para extração das fêmeas adultas para posterior caracterização bioquímica da(s) espécie(s) de *Meloidogyne* presente(s) na área. Para tanto, 20 fêmeas adultas de coloração branco-leitosa das raízes das plantas de cada bloco forma submetidas à eletroforese utilizando-se a isoenzima esterase conforme a metodologia descrita por Carneiro et al., (2001).

2.2.1.1.2 Caracterização das espécies de *Pratylenchus* e *Helicotylenchus*

Para a identificação das espécies dos gêneros *Pratylenchus* e *Helicotylenchus*, foram montadas laminas semipermanentes (TIHOHOD, 1993) em formalina ao 2%, onde os espécimes foram relaxados e fotomicrografados, utilizando-se o Software LAS V3.7 com o auxílio do microscópio Leica dm 1000 utilizando-se as objetivas de 10X, 20X, 40X, 60X e 100X. Para o gênero *Pratylenchus*, 20 fêmeas foram mensuradas quanto ao comprimento do corpo (L), comprimento do estilete (CE), Número de anéis na região lábia (NARL), comprimento do esôfago (CDE), Distância do anu à vulva (DAV), Distância da região anterior à vulva (DRAV), comprimento da cauda (CC), largura do corpo na região anal (LCRA) Distância da extremidade anterior da região labial à vulva/comprimento do corpo x 100 (V%) e determinação do número de anéis na região labial. Com base nesses parâmetros, procedeu-se identificação da(s) espécie(s) de *Pratylenchus*, com base as chaves de Loof (1991), Castillo e Vovlas (2007) e Gonzaga (2006).

Já para o gênero *Helicotylenchus*, 20 fêmeas adultas foram mensuradas quanto ao comprimento do corpo (L), distancia da base do estilete a abertura da glândula esofagiana (DEGO), Comprimento do estilete (CE), distância da região labial à vulva (DRAV), comprimento da cauda (CC) e distancia anterior até a vulva / comprimento do corpo x 100 (V%). Com base nesses valores, procede-se a identificação da(s) espécies(s) baseando-se na chave proposta por Sher (1966).

2.2.2 Obtenção, manutenção e caracterização molecular dos isolados rizobacterianos

Com base nos estudos *in vitro* e *in vivo* realizados por Brum (2017), Bisognin, (2017) e HELLER et al. (2018), foram selecionados cinco isolados bacterianos com capacidade de colonizar o sistema radicular tanto de cana-de-açúcar como de arroz-irrigado (Tabela 1) procedentes da coleção de micro-organismos de Embrapa Clima Temperado, sendo estes, primariamente isolados de rochas sedimentarias marinhas conhecidos também como folhelhos pirobetuminosos ou xisto (XT). Os mesmos foram preservados em tubos de ensaio contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970) a 4°C e em glicerol a 20% (V/V) a -20°C em freezer (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Quatro dos cinco isolados (XT21, XT23, XT38 e XT39) utilizados nesse estudo foram previamente identificados por Bisognin (2017) e Wille (2013) (Tabela 1) ao nível

de espécie por meio da caracterização molecular e amplificação da região 16S do gene rRNA e posterior sequenciamento.

Para o isolado XT56 (não identificado), O DNA foi extraído pelo método de lise alcalina. Células bacterianas presentes em 1,0 mL de cultura ($DO_{600}=0,1=1 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) foram precipitadas por centrifugação (12000 g por 2 min) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram suspensas em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e lisadas pela adição do tampão de lise (0,2 N NaOH, 1% SDS).

Tabela 2. Identificação/código dos isolados bacterianos usados na microbiolização.

Isolados - Identificação	Código
<i>Arthrobacter pascens</i> Lochhead and Burton 1953 **	XT21
<i>Micrococcus luteus</i> (Schroeter 1872) Cohn 1872 **	XT23
<i>Exiguobacterium acetylium</i> (Levine e Soppeland 1926) Farrow et al. 1994 **	XT38
<i>Micrococcus luteus</i> (Schroeter 1872) Cohn 1872 *	XT39
Não identificado	XT56

Rizobactérias identificados por sequenciamento do gene 16S rDNA por *Wille (2013) e **Bisognin (2017).

Subsequentemente, o lisado de células do isolado XT56 foi submetido à neutralização e precipitação com 300 µL de acetato de amônio 7,5 M, seguido de centrifugação por 5 min a 12000 X g. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. Logo, o DNA foi novamente precipitado com etanol 95% por centrifugação por 15 min a 12000 g. A etapa de lavagem do DNA para eliminar os sais foi realizada com etanol 70%, através de centrifugação por 5 min. O DNA dos isolados foi solubilizado em 50 ou 100 µL de água milli-Q, contendo RNase-A 1 mg.mL⁻¹.

Para a caracterização molecular foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 1492R (5-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3) e 27F (5-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) para o gene 16S rRNA (LANE, 1991).

Para amplificação da sequência parcial da região 16S rRNA foi utilizado: 30 µL GoTaq® Green Master Mix, 1 µM de cada oligonucleotídeo, 1 µL de DNA (60 ng) e o volume final de 50 µL foi completado com água miliQ. As amplificações ocorreram nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C/5 min; 30X de 95 °C/1 min, 54 °C/1 min e 72 °C/2 min; extensão final a 72°C/10 min. Os fragmentos amplificados

foram verificados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumetador.

Os produtos de PCR foram purificados de acordo com as recomendações do fabricante para o Kit SV Gel e PCR Clean-Up kit (Promega) e após enviados para sequenciamento. Após, as sequências obtidas foram analisadas no programa Bioedit e em seguida inseridas no GenBank, sediado no National Center for Biotechnology Information – NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), para confirmação da espécie.

2.2.3 Avaliação do emprego mudas de cana-de-açúcar microbiolizadas com rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento das plantas em condições de campo (cana-planta)

2.2.3.1 Produção de mudas de cana-de- açúcar

Para implantação do experimento, primeiramente foram produzidas mudas de cana-de açúcar do genótipo RB008347 proveniente do Programa de Melhoramento da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Sector Sucoenergético (RIDESA), através do sistema de produção de mudas pré-brotadas (MBP) conforme Landell et al. (2013).

Cada muda foi multiplicada a partir de colmos previamente coletados em campo, cortados a um tamanho aproximado de 3 cm, obtendo as gemas (mini-toletes). A seguir, passáramos minitoletes foram desinfestados com álcool 70% por um período de 5 minutos e, logo após, submersos em solução de hipoclorito de sódio ao 1% durante 15 minutos, seguido de três lavagens contínuas com água corrente para a eliminação dos resíduos. Após a desinfestação, foi realizada o plantio dos mini-toletes em tubetes individuais de 180 cm³ contendo substrato comercial esterilizado, em casa-de-vegetação a 25°C ± 5°C, onde foram mantidos por 10 dias para o seu brotamento e desenvolvimento inicial.

2.2.3.2 Preparo das suspensões bacterianas e microbiolização de mudas de cana-de-açúcar

As suspensões bacterianas foram obtidas a partir do cultivo de cada um dos isolados em (culturas puras) conforme mencionado no item 2.1.3. Nesse sentido, os isolados foram repicados em placas Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970)

e logo incubadas a 28°C por 48 horas. Após o crescimento bacteriano dos isolados procedeu-se a raspagem de cada um, separadamente, com o auxílio de alças Drigalski para um becker de 1L adicionando-se solução salina (NaCl 0,85%) estéril. A seguir cada suspensão bacteriana foi padronizada conforme com a correlação entre a densidade ótica a uma absorbância de 0,50 através de um espectrômetro.

Mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar do genótipo RB008347 com 10 dias após o plantio (3-5mm altura) e mantidas em tubetes com substrato (item 2.1.4), foram submetidas a microbiolização com 15mL de suspensão bacteriana de cada isolado Como controle negativo (testemunha), mudas de cana da mesma cultivar receberam 15mL de solução salina (NaCl 0, 85%). A seguir, as mudas microbiolizadas foram identificadas e mantidas por 10 dias em casa de vegetação a 25°C ± 5°C cujas regas foram realizadas diariamente para manutenção da umidade no substrato. Decorridos os 10 dias, as mudas de cada tratamento foram transplantadas para a área previamente preparada e naturalmente infestada com *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp. e *Helicotylenchus* sp. conforme detalhado no item 2.2.1.2.

2.2.4 Potencial de aplicação de rizobactérias em plantas de cana-soca no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento e produtividade da cultura em condições de campo

Logo após o corte dos colmos (cana-planta), quando as plantas alcançaram uma altura de 15 cm aproximadamente, em cada linha do plantio (Item 2.2.1), procedeu-se a microbiolização de cada planta, na interface entre as raízes e o solo, com a respectiva suspensão bacteriana conforme o isolado (Tabela 1) previamente ajustadas conforme o detalhado no item 2.2.4.2.

2.2.5 Avaliações em cana-planta e cana-soca

O experimento foi dividido em dois períodos de avaliações, sendo assim denominado em cana-planta (1-11 meses do plantio) e cana soca (12-22 meses do plantio).

2.2.5.1 Avaliação no período da cana-planta

2.2.5.1.1 Determinações de variáveis agronômicas e teor de clorofila

Entre oito e onze meses após o plantio das mudas, as plantas estabelecidas a campo foram avaliadas quanto ao número de perfilhos, teor de clorofila total e diâmetro do colmo.

O número de perfilho de cada planta na linha foi avaliado aos 210, 240, 270 e aos 330 dias após o estabelecimento das plantas nas parcelas. Para tanto, o valor de cada repetição foi obtido por meio da divisão do número total de perfilhos computados na área útil de cada parcela e dividido pelo número de plantas. O índice de clorofila total, foi avaliado nos mesmos períodos das contagens do número de perfilhos. Para tanto, as coletas de dados foram realizadas por meio do equipamento portátil SPAD-502-PLU cujas medições foram tomadas na folha diagnóstico +3 em três plantas de cana de açúcar da parcela escolhidas aleatoriamente, levando-se em consideração, a numeração proposta por Kuijper (DILLEWIJN, 1952). Já o diâmetro do colmo (mm), avaliado aos 330 dias após o plantio (DAP), foi medido na parte inferior do colmo localizada entre o primeiro e terceiro entrenó com o auxílio de um paquímetro digital. As avaliações dos teores de SST (°Brix) foram realizadas aos 210, 240 e 270 DPA por meio de um refractômetro de campo portátil Atagor® modelo Pal-1. As medidas foram efetuadas em dois pontos do colmo, sendo a primeira no terceiro nó acima do solo (inferior) e a segunda no terceiro nó considerando o primeiro colmo superior embaixo da formação da folha do cartucho (superior).

Decorridos 330 dias do plantio (DDP), procedeu-se o primeiro corte (manual) dos colmos das plantas (cana planta) a uma altura de aproximadamente 15 cm do solo por meio de um facão. A seguir, os colmos inteiros correspondentes a cada repetição, foram contabilizados e pesados com uma balança digital analógica adaptada a um trator para determinação do número de colmos por parcela, planta e por hectare; sendo, a seguir, avaliado o peso (Kg) dos colmos por parcela, planta e por hectare da mesma repetição, e, estimativa da produtividade de cana por hectare (kg ou T/ha). Na sequência, três colmos de cana-de-açúcar de cada parcela foram submetidos a prensagem através de uma prensa hidráulica para extração do caldo, o qual foi filtrado e medido (mL) através de uma proveta com capacidade de 2000mL. Simultaneamente, o conteúdo total (sólido) das amostras de colmos obtido da prensagem de cada parcela, foi seco em estufa de circulação de ar forçada a 65°C por um período de 96 horas para a determinação da matéria seca (MS).

Posteriormente a massa seca dos colmos de cada parcela foi triturada (\varnothing 1mm) em moinho modelo Willey obtendo-se conteúdo processado com diâmetro de aproximadamente 1mm. A seguir, 250 g de cada repetição foram utilizadas para realização das análises químico-bromatológicas e de digestibilidade.

2.2.5.1.2. Análises qualitativas da cana-de-açúcar

A partir da biomassa das amostras de matéria seca triturada de cada parcela, procedeu-se as análises bromatológicas do conteúdo de lignina (LIG), celulose (CEL), hemicelulose (HEM); e, de digestibilidade, pela determinação de fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA) no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal da Embrapa Clima Temperado.

Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), foram realizadas segundo o método proposto por Senger et al. (2008), onde amostras previamente secas e moídas (Item 2.1.6.1.1) foram pesadas (500 mg por cada amostra) e colocadas em sacos-filtro de poliéster. A seguir 50 mL de solução de detergente (neutro ou ácido) são vertidos por amostra, sendo posteriormente autoclavadas por um período de 40 minutos a uma temperatura 110°C.

A determinação teor de açúcares redutores (glicose e frutose) e não redutores (sacarose), foi realizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa de acordo à metodologia proposta por Lane Enyon citado na AOAC (1990) e identificadas pelo método de Somogyi, modificado por Nelson (1944).

2.2.5.1.3. Análises nematológicas

Imediatamente após a colheita, amostras compostas de solo e de raízes de cana de cada parcela foram coletadas conforme detalhado no item 2.1.1. Para tanto, alíquotas de 250cm³ de solo proveniente de cada amostra coletada foram processadas (Jenkins, 1964) para determinação da população final (PF) das populações de *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp. e *Helicotylenchus* sp. Para o nematoide-das-galhas, foi conduzido um bioteste em casa de vegetação utilizando-se amostras de mesmo volume cujos valores obtidos forma somados aqueles encontrados no solo para obtenção da população final média. A seguir, determinou-se o Fator de reprodução (FR) de cada um dos nematoides onde $FR = \text{população final}$

dividida pela população inicial (OOSTENBRINK,1996). Já para as amostras de raízes, uma alíquota de 10g de cada parcela foi processada conforme Hussey; Barker (1974) modificada por Bonetti e Ferraz (1981) para identificação (MAI; MULLIN, 1996) e quantificação do número de nematoides/10g de raízes dos mesmos gêneros acima citados, sob microscópio estereoscópio.

2.2.5.2 Avaliação no período da cana-soca

Após 210 da microbiolização em cana-planta, o teor de clorofila total, o diâmetro dos colmos, o número de perfilhos e o teor de sólidos solúveis totais (°Brix) da parte superior e inferior dos colmos foram avaliados mensalmente, totalizando quatro avaliações. As avaliações foram realizadas nos meses de junho, julho, agosto e setembro correspondido aos 240,270 e 300 dias, conforme o item 2.2.5.1.1.2

Decorridos 330 dias do corte e da 2ª aplicação das bactérias nas plantas, semelhantemente ao experimento anterior, foi avaliada diâmetro de colmo (DC), e produtividade de cana-de-açúcar em toneladas de matéria fresca por hectare (TMFH), número de colmo por planta (NCP), toneladas de colmos por hectare (TCH), quantidade de caldo por planta (QCP) quantidade de caldo por hectare (QCH) e teor solúveis totais (°Brix) conforme metodologias detalhadas no item 2.2.5.1.2. Da mesma forma, os níveis de celulose, lignina, hemicelulose, FDN e FDA conforme descrito no item 2.2.5.1.1.2.

2.2.5.2.1 Análises nematológicas

Decorridos 11 meses da colheita da cana-planta, amostras compostas de solo e de raízes de cana-de-açúcar (cana-soca) de cada parcela foram novamente coletadas conforme detalhado no item 2.1.1. De forma semelhante a cana-planta (2.1.5.1.1.3), amostras de solo e de raízes foram coletadas e processadas para determinação dos valores de FR e número de nematoides/10g de raízes nas diferentes parcelas dos diferentes tratamentos.

2.2.5.2.2 Análises estatísticas

Por fim, os dados referentes as variáveis agrônômicas e bioquímicas obtidos nas diferentes análises em cana-planta e cana-soca, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias de cada tratamento, a seguir, comparadas entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade utilizando-se o software SAS (SAS Institute 9.4, 2011). Da mesma forma, os dados referentes as variáveis nematológicas número de nematoides/10g de raízes (transformados em $\sqrt{x} + 1$) e fatores de reprodução dos nematoides foram submetidos à ANOVA e teste de comparação de médias pelo teste Duncan a 5% pelo mesmo programa.

2.3 Efeito nematicida dos isolados bacterianos sobre *Pratylenchus zaeae*

Em laboratório, avaliou-se a atividade nematicida dos cinco isolados bacterianos (XT56, XT23, XT39, XT21 e XT38) sobre formas ativas de uma população pura de *P. zaeae*, mantida em casa de vegetação. O bioensaio *in vitro* foi conduzido em placas de microtitulação tipo ELISA conforme Wille (2013).

Para tanto, cada orifício da placa foi considerado como uma repetição, onde foram adicionados 50 µL de água destilada, contendo 25 espécimes de *P. zaeae* e 50 µL da suspensão bacteriana de cada isolado, separadamente, a qual foi previamente padronizada em espectrofotômetro, conforme a densidade ótica, a uma absorvência $A_{540} = 0,50$. Como controle, orifícios da placa contendo 50 µL de suspensão aquosa com 25 espécimes do nematoide e 50 µL de solução salina (NaCl 0,85) foram utilizados. A seguir, as placas foram vedadas com filme plástico, cobertas com papel alumino e incubadas em BOD, a 28°C na ausência de luz. O ensaio foi estabelecido em delineamento inteiramente ao acaso e constou de quatro repetições para cada tratamento.

Decorridas 24 horas da montagem do ensaio, à cada repetição, foi adicionado 10 µL de NaOH (1N). A seguir, avaliou-se a mortalidade (número de nematoides mortos=NNM) dos nematoides, considerando como mortos os espécimes que permaneceram com o corpo completamente distendido durante 40 segundos após a adição de NaOH (CHEN; DICKSON, 2000). A partir dos valores de NNM, determinou-se a percentagem de mortalidade (efeito nematicida) em cada repetição.

A seguir, os valores de percentagem de nematoides mortos, transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$, foram submetidos à ANOVA, sendo as medias submetidas ao

teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% utilizando o software estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

2.4 Caracterização dos isolados bacterianos quanto a capacidade de biocontrole de fitonematoides e promoção de crescimento de plantas

Estudos complementares quanto à capacidade de biocontrole dos isolados bacterianos (Tabela 1), foram conduzidos em diversos testes quanto à produção de proteases em dois meios de cultura, um em Leite Litmus (PL) e outro em gelatina 12% (PG), de quitinases (Q), amônia (A) e lipases, em meio de cultura Tween 80 (L). Quanto à produção de compostos relacionados à promoção de crescimento de plantas, foram realizados os seguintes testes: solubilização de fosfatos, sideróforos, auxinas e solubilização de potássio.

2.4.1 Avaliação dos isolados bacterianos quanto a capacidade de biocontrole

A capacidade proteolítica dos isolados foi avaliada através do método proposto por Mariano e Silveira, (2005), utilizando-se a caseína como substrato em meio de cultura Leite-Ágar. A produção de protease foi confirmada com a formação e visualização de um halo translúcido ao redor das colônias, resultado da hidrólise da caseína (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

A capacidade lipolítica foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Fahy e Presley (1983), utilizando o meio de cultura de Tween 80 a 1% com pH ajustado a 7,4. A avaliação foi baseada na presença de halo de formação de precipitados ao redor das colônias.

Para avaliação da produção de amônia, os isolados bacterianos foram repicados em tubos de ensaio contendo 10mL de caldo de peptona e incubados a 25°C por 5 dias. Após o período de incubação, foi adicionado 1mL do reagente de Nessler por tubo (MARIANO; SILVEIRA, 2005). As avaliações foram realizadas de maneira qualitativa, observando-se a formação de um precipitado amarelo-alaranjado característico.

A produção de ácido cianídrico (HCN) foi determinada com base no protocolo descrito por Bakker e Schippers (1987). Primeiramente, os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio TSA (1/10), suplementado com glicina e cloreto de ferro

hexahidrato (CASTRIC,1975). Posteriormente, uma folha de papel filtro umedecido com solução de ácido pícrico a 0.5% e Na_2CO_3 a 2%, foi inserida na parte superior da placa, seguida da incubação a 28°C. Decorridas 24h de incubação, a mudança da coloração do papel de amarelo para vermelho alaranjado indicou a produção de HCN pelos isolados.

2.4.2 Avaliação dos isolados bacterianos quanto a capacidade de promoção de crescimento de plantas

A capacidade de solubilização de fosfato, foi determinada conforme método descrito por Nautiyal et al. (1999). Primeiramente, os isolados bacterianos foram repicados para placas de Petri com o meio de cultura específico NBRIP com modificações de pH (pH 7 e pH 5) e incubadas em BOD a 25°C por 21 dias. Posteriormente, a solubilização de fosfatos (fosfatase) foi avaliada de forma qualitativa, sendo que a formação de um halo ao redor das colônias confirmou a capacidade de solubilizar fosfato.

A determinação da capacidade de produção de auxinas do isolado XT39 foi conduzida através de ensaio colorimétrico (GORDON; WEBER, 1951). Para tanto, o isolado foi repicado em frascos de 150mL contendo 25mL de tripticaseína de soja (TSB) 10% suplementado com 150mg/L de L-triptofano, e, a seguir, incubado em BOD, no escuro, por três dias a 25°C. Subsequentemente, a cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 min retirando-se o sobrenadante. Imediatamente, adicionou-se ao tubo, o reagente de Salkowski [FeCl_3 0,5 mol/L + HClO_4 (35%)] na proporção de uma parte de reagente para duas de sobrenadante obtido. O sobrenadante tratado permaneceu 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em meio de cultura TSB 10%.

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Avaliação do potencial de rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e características agronômicas e químico-bromatólogicas em genótipo de cana RB008347 microbiolizado com cinco rizobactérias em condições de campo.

2.5.1.1 Identificação e caracterização das espécies de *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Helicotylenchus*

A partir da caracterização bioquímica do nematoide-das-galhas identificou-se a espécie *Meloidogyne javanica* Est J3 (Rm: 1,00; 1,24; 1,40) conforme padrão descrito por Carneiro et al. (2016) em todas amostras coletadas da área experimental em estudo.

Com relação ao nematoide-das-lesões (*Pratylenchus* sp.), pela análise das características morfológicas das fêmeas verificou três anéis na região labial, nódulos basais do estilete achatados e formato subagudo da cauda com termino liso; e dos parâmetros morfométricas (média: L = 443,8µm, ST = 16,3µm, V = 71,3%; a = 21,5µm, b = 4,9µm, c = 15,5µm e c' = 2,3µm), identificou-se *Pratylenchus zae* (Apêndice 1), confirmando a descrição dessa espécie caracterizada por Loof (1991), Castillo e Vovlas (2007) e Gonzaga (2006). Os intervalos das medidas e médias dos diferentes parâmetros estão apresentadas no Apêndice A.

Pela observação dos dados morfométricos (média L = 675,03µm; V = 64,23%; DEGO = 12,03; C = 37,14; O = 45,61) das fêmeas do nematoide espiralado mensuradas, identificou-se *Helicotylenchus dihystera* (Apêndice B), cujos dados obtidos (APENDICE B) para essa espécie estão de acordo com Sher (1966).

2.5.1.2 Caracterização molecular do isolado bacteriano XT56

De acordo com o resultado da análise de sequência do sequenciamento parcial do gene 16S no Genbank, a bactéria foi identificada como *Bacillus megaterium* Bary.

2.5.1.3 Efeito da microbiolização de mudas de cana-de-açúcar com rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento em cana-planta sob condições de campo

2.5.1.3.1 Eficiência dos tratamentos bacterianos no biocontrole de fitonematoides

Em relação ao biocontrole dos fitonematoides nos diferentes tratamentos bacterianos (Tabela 2), 11 meses após o plantio das mudas (cana-planta), verificou-se que todos os isolados bacterianos suprimiram a reprodução do nematoide-das-galhas nas raízes, resultando em reduções médias de 78,5% em relação ao tratamento cujas mudas não foram microbiolizadas. No entanto, na avaliação do FR de *M. javanica*, obtido pelas populações do nematoide no solo, apenas XT21 e XT23 resultaram em menores valores ($P < 0,05$).

Já para o nematoide-das-lesões, somente o tratamento das mudas com XT39 afetou negativamente o número de nematoides nas raízes, promovendo redução de 40,53% da população em relação a testemunha; porém, não observou efeito de nenhum dos tratamentos sobre a supressão do nematoide no solo, dada pelo FR. Em relação ao biocontrole do nematoide espiralado, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade biocontroladora de cinco isolados bacterianos no manejo do nematoide-das-galhas, das lesões e espirados em cana-planta.

Tratamentos bacterianos	<i>M. javanica</i>		<i>P. zaeae</i>		<i>H. dihystra</i>	
	NJ20/10gR	FR	NN/10gR	FR	N/10gR	FR
Testemunha**	83,3a	0,47a	756,7a	10,7abc	223,3 ^{ns}	0,28 ^{ns}
XT 21	35,4b*	0,21bc	516,7ab	11,9ab	193,3	0,58
XT 23	10,8b	0,04c	766,7a	5,89c	363,3	0,47
XT 38	25,6b	0,35ab	520,0ab	15,6a	196,7	0,58
XT 39	21,4b	0,51a	450,0b	9,5bc	331,7	0,36
XT 56	20,6b	0,36ab	620,0ab	15,9a	313,3	0,53
CV%	39,48	6,86	16,27	16,41	33,25	7,31

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; NS- não significativo; CV=Coeficiente de variação; NJ20/10gR – número de J2 + ovos de nematoides/10g de raízes; NN/10gR – número de nematoides/10g de raízes; FR- fator de reprodução, **Água salina.

2.5.1.3.2 Efeito dos tratamentos bacterianos sobre diferentes variáveis qualitativas e produção da cana-de-açúcar

Conforme os resultados observados na tabela 3, verificou-se que os tratamentos bacterianos (XT21, XT23, XT38, XT39 e XT56) evidenciaram diferentes

respostas para as variáveis associadas à promoção de crescimento e produtividade em cana-planta.

Avaliando os índices de clorofila total (CT), observou-se significância estatística em função dos tratamentos bacterianos. Na primeira avaliação, aos 210 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto (Tabela 3).

Tabela 4. Efeito de diferente tratamento bacterianos sobre o índice de clorofila total e número de perfilhos em plantas de cana-de-açúcar microbiolizadas com cinco isolados bacterianos aos 210, 240, 270 e 300 após o transplante (cana-planta).

Tratamentos Bacterianos	Clorofila total				Número perfilho/planta			
	Dias após o plantio							
	210	240	270	300	210	240	270	330
Testemunha	47,71a*	37,86c	31,65c	31,84d	5,22 ^{ns}	8,24a	7,01 ^{ns}	7,01 ^{ns}
XT 21	36,07a	39,39bc	35,72b	33,80cd	4,75	8,65a	7,27	7,27
XT 23	39,92a	41,18ab	36,06b	36,97b	5,62	8,97a	7,67	7,67
XT 38	43,26a	42,95a	40,55 ^a	40,07a	5,03	7,45b	6,8	6,82
XT 39	43,00a	42,21ab	37,64b	38,98ab	4,81	7,59b	6,55	6,55
XT 56	39,36a	41,89ab	35,23c	36,33bc	5,57	7,85b	6,64	6,64
CV%	15,55	4,88	5,29	5,75	12,46	5,58	20,31	20,31

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV= Coeficiente de variação.

A partir dos 240 dias, todos isolados resultaram em algum incremento no conteúdo de clorofila total. A microbiolização das mudas de cana com os isolados XT23, XT38 e XT39 resultaram em aumentos significativos aos 240, 270 e 300 dias após o transplante (DAT), resultando em aumentos médios de 42, 38,08 e 38,67% no conteúdo de clorofila, comparativamente a testemunha, destacando-se o tratamento com XT38 com os maiores valores nos dois últimos períodos observados. Já para os isolados XT56 e XT21, efeito significativo com acréscimos no conteúdo de tal variável foi observado aos 240 e 300; e 270 DAT da cana, respectivamente. Com relação ao número de perfilhos (Tab. 3), embora na 2ª avaliação (240 DAT) tenha ocorrido maior número de perfilhos/planta com os tratamentos XT21, XT23 em relação a testemunha, o efeito não foi significativo para os demais períodos (210, 270 e 300 DAT).

Analisando-se o conteúdo dos SST, verificou-se que embora não tenha havido diferenças entre os tratamentos aos 240 e 270 DAT no terço inferior dos colmos, em ambos períodos, no terço superior proveniente das plantas previamente

microbiolizadas com XT38 houve incremento de 1,5 a 2,0°Brix em relação a testemunha. Quando tomada a média das duas variáveis, apenas para o primeiro período verificou-se significância com maiores valores também para o tratamento das mudas com XT56 (Tabela 4).

Na avaliação dos componentes da produtividade, após a colheita da cana-de-açúcar, verificou-se significância ($P \leq 0,05$) para a grande maioria das variáveis analisadas [diâmetro do colmo (DC), números colmos por planta (NCP), parcela (NCP) e por hectare (NCH), teor de sólidos solúveis totais (DBC) massa fresca de colmos por planta (MFCP), por parcela (MFCPP) e por hectare (MFCH)]. Apenas para as variáveis associadas ao caldo [volume de caldo por planta (VCP) e volume de caldo por hectare (VCH)] não houveram diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 5. Efeito de diferentes tratamentos bacterianos sobre o conteúdo de sólidos solúveis totais (°Brix) no terço inferior e superior dos colmos de cana-planta, e, a média, aos 240 e 270 dias após o transplante das mudas para o campo (cana-planta).

Tratamentos Bacterianos	Sólidos Solúveis Totais (°Brix)					
	240 DAT			270 DAT		
	TIC	TSC	Media	TIC	TSC	Media
Testemunha	19,32 ^{ns}	17,52b*	18,29b	20,33 ^{ns}	19,25bc	21,30ab
XT 21	19,3	17,94ab	18,62ab	18,44	17,99b	19,44ab
XT 23	19,44	18,44ab	18,94ab	20,79	17,25c	20,09ab
XT 38	19,46	19,18 ^a	19,32a	20,72	21,45a	21,72ab
XT 39	19,00	17,88b	18,44ab	20,91	21,14ab	21,90a
XT 56	19,82	18,76ab	19,29a	17,19	17,07b	18,19b
CV%	3,47	4,78	3,47	3,47	8,34	12,75

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV= Coeficiente de variação; NS- não significativo; TIC- terço inferior do colmo; TSC- terço superior dos colmos.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, os tratamentos com os isolados XT38 e XT21 forma aqueles onde houve maior incremento em relação as variáveis repostas associadas a produção. Nesse sentido, verificou-se aumento do NCP, NCPH, MFCPP e MFCH para ambos isolados em, 6,9% dos valores das variáveis associadas ao número de colmos, e 38% da massa fresca dos colmos por parcela e por hectare em relação à testemunha cujas plantas não foram microbiolizadas com bactérias. Além disso, também houve incremento significativo do DC e do NCP no tratamento cujas mudas de cana foram microbiolizadas com XT38.

Embora os tratamentos com XT23 e XT39 tenham resultado em algum incremento do DC e do NCP, respectivamente, tal efeito não afetou os componentes produtivos (Tabela 5). Apesar dos valores de SST (sólidos solúveis totais) na colheita terem sido menores que aqueles obtidos nos colmos das plantas avaliadas anteriormente (Tabela 4), aumentos significativos de aproximadamente 1°Brix foram observados no caldo dos colmos cujas plantas foram microbiolizadas com XT23.

Quanto às variáveis associadas ao caldo (VCP e VCH) da cana-planta, não houveram diferenças significativas entre tratamentos (Tabela 5).

Tabela 6. Efeito de cinco rizobactérias sobre o diâmetro do colmo (DC), número de colmo/planta (NCP), número de colmos/parcela, (NCP), número de colmos/ha (NCPH), massa fresca dos colmos/planta (MFCP), teor de sólidos solúveis totais (°Brix) do caldo (BDC), massa fresca dos colmos/planta (MFCP), massa fresca dos colmos/parcela (MFCPP), massa fresca de colmos/hectare (MFCH), volume do caldo/planta (VCP) e volume de caldo/ha (VCH) em cana-planta na colheita (330 DAT/cana-planta).

Tratamentos bacterianos	DC	NCP	NCPH	NCH	BDC	MFCP	MFCPP	VCP	QCH	MFCH
	(mm)			(*1000)	(°Brix)	-----Kg-----	-----L-----			(T\ha)
Testemunha	27,74b*	4,31b	51,62bc	92,18bc	14,7bc	4,30ab	37,29b	1,94 ^{ns}	3377 ^{ns}	66,60b
XT 21	29,52ab	4,17b	56,46a	100,83a	14,56bc	4,18b	53,77a	1,98	3144	94,23a
XT 23	31,99a	4,70b	53,35ab	95,26ab	15,56a	4,70ab	40,31b	1,73	3024	71,99b
XT 38	32,05a	5,23a	53,91a	96,27ab	15,2ab	5,22a	50,37a	1,88	3376	89,95a
XT 39	31,29ab	5,22a	48,08c	85,87c	14,16c	5,21a	35,70b	1,44	2564	63,75b
XT 56	29,98ab	4,27b	51,23bc	91,49bc	14,86abc	4,27b	35,13b	1,77	3077	62,74b
CV%	8,64	12,81	20,09	16,85	4,45	12,81	14,88	37,77	30,38	17,9

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV= Coeficiente de variação; ns- não significativo.

Com relação ao conteúdo de compostos da parede celular obtidos nos colmos (Tabela 6), verificou-se redução significativa dos níveis celulose em reação à testemunha no tratamento com XT38, e, maiores níveis com XT23. Porém, para hemicelulose o efeito não foi significativo ($P>0,05$); e, para lignina, embora menores valores tenham sido observados com XT56, tal tratamento não diferiu da testemunha. Já para os valores de fibra bruta, para aquela obtida em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA), menores valores foram observados no tratamento com o isolado bacteriano XT38; e, apenas para FDA, com XT39.

Quanto ao conteúdo de açúcares não redutores, nos tratamentos das plantas com os isolados XT21, XT38 e XT56, verificou-se maiores valores de sacarose. Já para os níveis de açúcares redutores, apenas no tratamento com o isolado XT21 observou-se menores valores de glicose significativos, os quais apesar de estatisticamente semelhantes aqueles obtidos com XT23 e XT56, diferiram da testemunha não microbiolizadas (Tabela 6).

Tabela 7. Efeito de cinco rizobactérias sobre os teores de hemicelulose (HEMI), celulose (CEL), lignina (LIG), de fibra bruta em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA), e, conteúdo de glicose e sacarose em plantas de cana-de-açúcar aos 330 dias após a microbiolização das mudas (cana-planta).

Tratamentos Bacterianos	HEMI	CEL	LIG	FDN	FDA	Glicose	Sacarose
	------(%)-----					(g /100g amostra)	
Testemunha	15,52 ^{ns}	6,05b	37,44ab	59,01a*	43,49ab	4,47c	11,23d
XT 21	13,35	5,30bc	41,57 ^a	60,22a	46,88a	3,74d	20,39a
XT 23	16,86	7,11a	37,67ab	61,64a	44,79ab	3,87cd	11,50cd
XT 38	16,25	4,93c	34,54b	55,05b	38,81c	5,18b	14,08c
XT 39	15,63	5,30bc	36,34ab	57,89ab	42,27c	5,89a	12,60cd
XT 56	15,82	5,35bc	37,16b	57,49ab	41,70bc	4,32cd	16,14b
CV(%)	18,96	13,53	4,18	2,36	3,56	13,64	9,95

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; CV= Coeficiente de variação; ns- não significativo.

2.5.3.1.4 Efeito da microbiolização de mudas de cana-de-açúcar com rizobactérias no biocontrole de fitonematoides e na promoção de crescimento em cana-soca sob condições de campo

2.5.3.1.4.1 Eficiência dos tratamentos bacterianos no biocontrole de fitonematoides

De uma forma geral, verificou-se que todos os tratamentos bacterianos afetaram negativamente os índices populacionais de *M. javanica* e *P. zaeae* nas raízes e ou no solo. E, para *H. dihystera*, exceto 'XT21', todos os demais tratamentos das mudas de cana resultaram em alguma supressão das populações desse nematoide (Tabela 7). Considerando-se as três espécies de nematoides, XT38, XT23 e XT56 foram efetivos no biocontrole, em cana-soca, independentemente do parâmetro avaliado.

Na avaliação dos tratamentos sobre as populações do nematoide-das-galhas, níveis de controle 25 e 40,75% do número de nematoides/10g raízes, foram obtidos com os isolados XT21\XT56 e XT23\XT38\XT39, respectivamente. Já para os valores de FR, verificou-se supressão de *M. javanica*, no solo, em mais de 80% comparativamente a testemunha ($P < 0,05$), independentemente do isolado bacteriano.

De maneira semelhante, para *P. zaeae*, verificou-se níveis médios de supressão de 43,85 no número de nematoides nas raízes nos tratamentos cuja cana foi microbiolizadas com XT21, XT23, XT38 e XT56; e, menores valores de FR de *P. zaeae* nos tratamentos bacterianos XT38, XT39 e XT56, cuja redução média do patógeno no solo foi de 41,37%.

Em relação ao nematoide espiralado (*H. dihystera*), observou-se supressão significativa do número de nematoides nas raízes das plantas de cana com XT23, XT38 e XT56 de 63,74%; e, redução dos valores de FR no solo nesses mesmos tratamentos em XT39, cuja redução média foi de aproximadamente 50% em relação a testemunha não microbiolizada.

Tabela 8. Atividade biocontroladora de rizobactérias no manejo do nematoide-das-galhas, das lesões e espirados em cana-soca aos 330 após a segunda aplicação (no solo).

Tratamentos bacterianos	<i>M. javanica</i>		<i>P. zeae</i>		<i>H. dihystra</i>	
	NJ2O/10Gr	FR	NN/10gR	FR	N/10gR	FR
Testemunha	380a	68,57a	262,77a	5,48ab	570,00a	7,85ab
XT 21	320b	22,22b	180,55b	7,29a	398,33ab	9,24a
XT 23	210c	10,39b	135,55b	4,08bc	196,66b	4,5bc
XT 38	180c	3,22b	112,77b	2,63c	196,66b	3,17c
XT 39	250b	11,89b	258,33 ^a	2,92c	363,33ab	4,53bc
XT 56	290b	7,90b	154,43b	3,22c	226,66b	3,58c
CV%	14,1	39,18	18,72	12,75	29,91	19,56

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; NS- não significativo; CV=Coeficiente de variação; NJ2O/10gR – número de J2 + ovos de nematoides/10g de raízes; NN/10gR – número de nematoides/10g de raízes; FR- fator de reprodução.

2.5.3.1.4.2 Efeito dos tratamentos bacterianos sobre diferentes parâmetros de desenvolvimento, variáveis qualitativa e de produção em cana-soca

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 8, observou-se que todos os tratamentos bacterianos resultaram em algum incremento dos índices de clorofila total (CT) ao longo três últimos períodos avaliados em cana-soca. Nesse sentido, uma segunda inoculação dos isolados bacterianos XT23, XT38 e XT39 promoveu aumento no conteúdo de CT em 11,23, 14,42-28,6 e 16,11-24,13% aos 240, 270 e 300 dias após o corte e 2ª aplicação das rizobactérias (D2ªAR) das plantas de cana em relação à testemunha. Da mesma forma, em XT21, aos 270 D2ªAR; e, em XT56 aos 240 e 300 2ªAR, verificaram-se aumentos significativos ($P < 0,05$) no aumento de CT de 11,06 a 17,54%, respectivamente.

Em relação ao número de perfilhos/planta (NPP), embora tenha sido verificado maiores valores aos 210 e 240 D2ªAR, aos 270 D2ªAR não houveram diferenças significativas entre os tratamentos; e, aos 300 D2ªAR, houve uma pequena redução nos índices de CT no tratamento das plantas com XT56 ($P < 0,05$), conforme pode ser observado na tabela 8.

Tabela 9. Efeito de diferente tratamento bacterianos sobre o índice de clorofila total e número de perfilhos em plantas de cana-de-açúcar microbiolizadas com cinco isolados bacterianos aos 210, 240, 270 e 300 dias após a segunda aplicação em cana-soca.

Tratamentos Bacterianos	Clorofila total				Número perfilho/planta			
	Dias após o corte e 2ª aplicação das rizobactérias							
	210	240	270	300	210	240	270	300
Testemunha	29,9 ^{ns}	37,86c	31,65c	31,84d	7,21b	7,21b	9,41 ^{ns}	9,6a
XT 21	31,8	39,39bc	35,72b	33,80cd	8,42a	8,42a	9,65	10,0ab
XT 23	31,0	41,18ab	36,06b	36,97b	7,83ab	7,83ab	8,63	8,8ab
XT 38	32,9	42,95a	40,55a	40,07a	7,22ab	7,22ab	8,22	8,2ab
XT 39	32,1	42,21ab	37,64b	38,98ab	6,61b	6,61b	8,18	8,4ab
XT 56	31,5	41,89ab	35,23c	36,33bc	7,02ab	7,02ab	8,01	8,0b
V%	10,12	4,88	5,29	5,75	14,55	14,55	16,83	14,16

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; NS- não significativo; CV=Coeficiente de variação;

De acordo com os dados apresentados na Tabela 9, verificaram-se diferenças significativas entre os tratamentos nos períodos de 210 e 240 D²AR das plantas para sólidos solúveis totais (°Brix). Aos 210 D²AR, embora não tenha sido observado efeito significativo para a amostragem do caldo no terço inferior (TI) dos colmos, no terço superior (TS), observou-se maior teor de SST nos tratamentos bacterianos com XT21, XT38, XT39 e XT56 comparativamente a testemunha, resultando em um acréscimo de 2,6°Brix.

Já aos 240 D²AR, verificou-se maior teor de SST no TI dos colmos com XT21, XT23 e XT38, cujos acréscimos foram de 6,02 °Brix para os dois primeiros e de 3,37°Brix para XT38. Na avaliação do TS, apenas XT21 e XT38 diferiram da testemunha, resultando em aumento médio de 3,62 °Brix. Na avaliação da média dos valores de SST do TI e do TS dos colmos, aos 210 e 240 D²AR, nota-se, também, incremento significativo dessa variável para o tratamento com XT23. No entanto, aos 300 D²AR, não foi observada diferenças significativas entre os tratamentos para SST em cana-soca.

Tabela 10. Efeito de diferentes tratamentos bacterianos sobre o conteúdo de sólidos solúveis totais (°Brix) no terço inferior, superior e média dos colmos de cana-soca após 240 e 270 dias após o transplante das mudas para o campo.

Tratamentos Bacterianos	SST (°Brix)								
	210 D2 ^a AR			240 D2 ^a AR			270 D2 ^a AR		
	TI	TS	Media	TI	TS	Media	TI	TS	Media
Testemunha	11,99 ^{ns}	8,82b*	10,39ab	14,73c	12,47b	13,66b	16,39 ^{ns}	16,64 ^{ns}	16,52 ^{ns}
XT 21	11,93	12,99a	12,46a	20,43a	16,12a	18,27a	16,41	16,68	16,51
XT 23	11,39	9,05b	10,23b	21,07a	15,42ab	18,24a	17,61	16,13	16,87
XT 38	12,35	10,82a	11,58ab	18,10b	16,06a	17,07a	17,73	17,08	17,41
XT 39	11,46	11,36a	11,41ab	15,94bc	13,80ab	14,87b	17,04	16,11	16,57
XT 56	11,99	10,48a	11,23ab	16,82bc	12,85ab	14,83b	16,94	16,32	16,63
CV%	12,45	10,41	13,37	11,58	16,06	13,8	7,54	7,83	6,19

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; NS- não significativo; D2^aAR– dias após a 2^a aplicação das rizobactérias; CV=Coeficiente de variação.

Na tabela 10, diferenças significativas entre os tratamentos para a maioria das variáveis associam a produtividade e qualidade do caldo, foram observadas na colheita. Na avaliação do diâmetro do colmo (DC), pequeno aumento significativo ($P < 0,05$) foi observado nos tratamentos com XT21 e XT38. Para as variáveis número de colmo/planta (NCP), número de colmos/parcela, (NCPP) e número de colmos/ha (NCPH), aumentos significativos de 21,12% em relação a testemunha não microbiolizadas, foram observados.

Em relação ao teor de SST do caldo, na colheita, verificaram-se valores menores em relação períodos anteriores avaliados; e, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Porém, pela análise do volume do caldo, muito embora maiores valores de VCP tenham sido verificados para XT23, aumentos significativos por unidade de área (QCH) foram obtidos somente com o isolado XT21, o que representou um acréscimo de mais de 8 mil litros por hectare comparativamente à testemunha.

Para as variáveis relacionadas à massa fresca dos colmos, aumentos significativos de MF CPP e MF CPH foram observados utilizando-se os tratamentos bacterianos das plantas com XT21 e XT23. Nesse sentido, utilizando-se tais bactérias, obteve-se, em média, 18T de cana-de-açúcar a mais por hectare em comparação a testemunha não microbiolizada.

Na avaliação dos componentes estruturais da parede celular dos colmos, em cana-soca (Tabela 11), não houveram diferenças significativas entre os tratamentos para hemicelulose (HEMI), lignina (LIG) e fibra bruta em detergente ácido. Já para celulose, reduções significativas ($P < 0,05$) foram verificadas nos tratamentos com XT21, XT38, XT39 e XT56. Para fibra bruta em detergente ácido (FDA), nos tratamentos com XT23 e XT38, foram verificadas reduções significativas comparativamente a testemunha.

Tabela 11. Influência de cinco rizobactérias sobre o diâmetro do colmo (DC), número de colmo/planta (NCP), número de colmos/parcela, (NCP), número de colmos/ha (NCPH), massa fresca dos colmos/planta (MFCP), teor de sólidos solúveis totais (°Brix) do caldo (BDC), massa fresca dos colmos/planta (MFCP), massa fresca dos colmos/parcela (MF CPP), massa fresca de colmos/hectare (MFCH), volume do caldo/planta (VCP) e volume de caldo/ha (VCH) em cana-soca na colheita (330 dias após a 2ª aplicação).

Tratamentos Bacterianos	DC (mm)	NCP	NCP	NCH (*1000)	BDC (°Brix)	MFCP -----Kg-----	MF CPP	VCP -----L-----	QCH	MFCH (T/ha)
Testemunha	29,31b	5,22b	41,79b	74,63b	19,55 ^{ns}	6,29b	60,58c	1,53b	4628,12bc	108,18c
XT 21	31,04a	6,37a	50,93a	90,95a	20,62	8,16a	71,59a	1,94ab	13098,22a	127,84a
XT 23	28,99b	6,29a	50,31a	89,84a	20,82	7,30ab	69,99ab	2,05a	7100,27 b	124,99ab
XT 38	31,12 ^a	5,06b	40,48b	72,28b	20,74	6,27b	62,72bc	1,89ab	3908,65 c	112,11bc
XT 39	28,75b	4,63b	37,02b	66,12b	20,64	5,90b	56,47c	1,88ab	5206,44 bc	100,84c
XT 56	29,15b	5,54ab	44,32ab	79,15ab	20,78	5,89b	54,16c	1,85ab	7720,27 b	96,71c
CV%	8,71	13,25	20,09	13,25	5,51	16,31	11,83	18,44	32,15	9,87

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; NS- não significativo; CV=Coeficiente de variação;

Na avaliação dos açúcares não redutores (Tabela 11) das amostras de colmos colhidos, em cana-soca, maiores níveis de sacarose foram observados nos tratamentos bacterianos com XT23, XT38, XT39 e XT56. Embora nesses mesmos tratamentos tenha sido verificado os menores teores de açúcares redutores (glicose), nas plantas microbiolizadas que receberam o isolado XT56, após o primeiro corte (2ª aplicação), detectou-se a maior diferença, cuja redução foi aproximadamente a metade comparativamente à testemunha não microbiolizada. E, na avaliação dos níveis de glicose (açúcares redutores), estes mesmos isolados forma aqueles que apresentaram os menores valores ($P < 0,05$).

Tabela 12. Influência de cinco rizobactérias sobre os teores de hemicelulose (HEMI), celulose (CEL), lignina (LIG), de fibra bruta em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA), e, conteúdo de glicose e sacarose produzidos por plantas de cana-de-açúcar, 330 dias após a segunda aplicação (solo) em cana-soca.

Tratamentos Bacterianos	HEMI	CEL	LIG	FDN	FDA	Glicose	Sacarose
	(%)					(g/100g da amostra)	
Testemunha	23,11 ^{ns}	4,56a	15,56ab	52,64 ^{ns}	29,53a	4,94a	19,51b
XT 21	23,16	2,94b	20,00a	51,32	28,15ab	4,30ab	22,66ab
XT 23	24,86	5,30a	18,03ab	51,6	26,74b	3,67bc	26,71a
XT 38	25,72	2,58bc	13,32b	51,41	25,68b	2,91cd	25,28a
XT 39	22,89	1,44c	19,52a	52,74	29,84a	3,15cd	26,83a
XT 56	22,8	2,22bc	19,79a	52,86	30,06a	2,63d	23,70a
CV (%)	12,11	13,05	9,74	5,05	6,52	16,90	12,29

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; NS- não significativo; CV=Coeficiente de variação;

2.5.3.1.5 Avaliação do efeito nematicida dos isolados bacterianos sobre *Pratylenchus zae*

De acordo com os dados apresentados na tabela 12, verificou-se que os isolados bacterianos XT21, XT56 e T23) apresentaram atividade nematicida sobre os espécimes de *P. zae* comparativamente a testemunha. O maior índice de mortalidade ($P \leq 0,05$) foi obtido com o isolado XT21 (*Arthrobacter pascens*), seguido dos outros dois isolados, cujos percentuais de mortalidade foram de 62,95 e 31,25% em relação a testemunha, respectivamente.

Tabela 13. Percentagem da mortalidade *in vitro* de espécimes de *Pratylenchus zeae* 24h após o tratamento com os isolados bacterianos XT21, XT56, XT23, XT39 e XT38.

Tratamentos bacterianos	Mortalidade (%)
XT21	74,69**a*
XT23	44,67 b
XT56	41,09 b
XT38	31,00 c
XT39	23,88 c
Testemunha (água salina)	32,67 c
CV (%)	12,11

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade; ** dados transformados em arco seno $\sqrt{x|100}$.

2.6 Caracterização dos isolados bacterianos quanto a capacidade de biocontrole de fitonematoides e promoção de crescimento de plantas

De acordo com as metodologias utilizadas, observou-se que todos os isolados foram capazes de produzir pelo menos um composto associado ao biocontrole e/ou promoção de crescimento (Tabelas 13 e 14).

Em relação a capacidade de biocontrole, pela avaliação das atividades proteolíticas (Tabela 13), mediante o emprego protease em meio ágar-leite, verificou-se que todos os isolados foram capazes de formar halos no meio, sendo, portanto, considerados produtores da enzima protease; porém quando testou-se a produção de proteases em leite Litmus e em gelatina, menor número de isolados apresentaram tal funcionalidade.

Tabela 14. Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos XT21, XT23, XT38, XT39 e XT56 quanto à capacidade de biocontrole.

Isolados bacterianos	Identificação	PL	PG	PLA	L	A	NCH	N°CP
XT21	<i>Arthrobacter pascens</i>	+	+	+	-	-	+	2
XT23	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	+	-	+	-	2
XT38	<i>Exiqubacterium acetylium</i>	-	+	+	-	+	+	3
XT39	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	+	-	+	-	2
XT56	<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	+	-	+	-	2

Produção de proteases em leite Litmus (PL), em gelatina (PG) e em Leite-Agar (PLA); produção de lipases em Tween 80 (L); produção de amônia (A); produção de ácido cianídrico (NCH); composto produzido (+) e não produzido (-); e, número de compostos produzidos (N°CP).

A produção de amônia foi detectada em quatro dos cinco isolados testados (XT23, XT38, XT39 e XT56); enquanto que a atividade cianogênica foi observada apenas em 'XT21' e 'XT38'. Porém, para produção de lipase, nenhuma das rizobactérias testadas foi capaz de produzir tal enzima.

Analisando os compostos relacionados a promoção de crescimento de plantas, verificou-se que apenas o isolado bacteriano XT38 foi capaz de solubilizar fósforo em meio NBRIP em pH 7,0 (Tabela 14). Porém, na avaliação desse mesmo isolado em pH 5,0, observou-se um halo de degradação à volta da colônia, demonstrando tal capacidade enzimática.

Tabela 15. Caracterização bioquímica de isolados bacterianos XT21, XT23, XT38, XT39 e XT56 quanto à capacidade de produção de compostos relacionados à promoção de crescimento de plantas.

Isolados bacterianos	Identificação	P*	AIA	N°CP
XT21	<i>Arthrobacter pascens</i>	-	+*	1
XT23	<i>Micrococcus luteus</i>	-	+*	1
XT38	<i>Exigubacterium acetylium</i>	+	nd	1
XT39	<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	1
XT56	<i>Bacillus megaterium</i>	-	nd	0

Produção de fosfatase (P) em pH 7,0, produção de auxina (AIA), produção do composto (+), não produz composto (-). Número de compostos produzidos (N°. C. P); *Brum (2017); nd- não determinado.

Na avaliação dos níveis de auxina, observou-se uma grande quantidade de AIA produzida pelo isolado XT39 com 37,66µg AIA/mL.

De modo geral, todos os isolados avaliados foram capazes de produzir mais de três compostos relacionados com o biocontrole e/ou promoção de crescimento de plantas, sendo os isolados bacterianos XT21 (*A. pascens*) e XT38 (*E. acetylium*) aqueles que mais se destacaram.

2.7 Análise conjunta dos resultados

De acordo, com os dados obtidos nesse estudo, verificou-se que a microbiolização das mudas de cana-de-açúcar com os cinco isolados bacterianos resultou em redução significativa de *M. javanica* tanto nas raízes como no solo em cana-planta e em cana-soca. No entanto, para *P. zea*, a redução dos níveis

populacionais em todos os tratamentos foi observada somente ao final do segundo ciclo produtivo, em cana-soca, uma vez que apenas nos tratamentos com XT39 e XT23 houve supressão significativa em cana-planta. Já os níveis de biocontrole de *H. dihystera* nas raízes e no solo foram verificados apenas em cana-soca, especialmente com XT38 e XT56. Estas variações podem estar relacionadas à atividade de enzimas líticas relacionadas à composição da cutícula dos três nematoides, assim como também aos compostos antagônicos produzidos pelos diferentes isolados (XT21, XT23, XT38, XT39 e XT56) e ao período de aplicação da rizobactérias.

Segundo Page (2001), a cutícula dos nematoides, é uma estrutura composta de seis capas estruturais de proteínas extracelulares (colágenos, cutículas, proteínas e lipídios e hidratos de carbono) complexas altamente reticuladas, solúveis e insolúveis, as quais variam segundo o estágio de desenvolvimento do nematoide, o gênero e inclusive pelas diferenças entre indivíduos da mesma espécie (DECRAEMER; HUNT;2006). Neste estudo, todas as rizobactérias testadas *in vitro* apresentaram a capacidade de produzir enzimas proteases, as quais podem estar relacionadas ao efeito nematicida sobre os espécimes de *M. javanica*, *P. zaeae* e *H. dihystera* observado, *in vivo*, no campo.

As proteases são conhecidas por catalisarem a hidrólise de proteínas, liberando uma mistura de aminoácidos, que atuam na barreira semipermeável, da cutícula do nematoide, o qual apresenta diferentes tipos de proteínas estruturais, cujas proporções mudam ao longo de seu ciclo de vida. Portanto, enzimas proteolíticas produzidas por PGPR são consideradas como fatores de virulência em sua patogênese contra nematoides (LIAN et al.,2007). Em trabalhos desenvolvidos por Wille (2013), a autora demonstrou que a atividade enzimática predominante de 124 isolados bacterianos foi de proteases em 39% dos isolados testados; cuja capacidade foi associada à inibição a eclosão do nematoide das galhas [(*M. incognita* (Kofold & White) Chitwood)] verificada em testes *in vitro*. De igual maneira, Brum (2017) ao avaliar a produção de protease dos isolados XT21 (*A. pascens*) e XT23 (*M. luteus*), também observou que o isolado XT21 produziu essa enzima relacionando à redução da penetração e reprodução de *M. graminicola* em plantas de arroz irrigado.

Os níveis de biocontrole de *M. javanica* e *P. zaeae* observada a campo com XT21 e XT38 podem também estar relacionados à produção *in vitro* de ácido cianídrico (HCN) verificada nesse estudo. O HCN é um composto volátil de baixa polaridade caracterizado por se espalhar por longas distâncias e elaborar um microambiente

bacteriostático o qual contribui para o controle biológico de fitonematoides (RAZA; YOUSAF; RAYER, 2016; PAGANS et. al., 2006). Segundo Siddiqui et al., (2006) a produção deste composto por cepa selvagem do gênero *Pseudomas* exerceu atividade nematicida contra *M. javanica* em comparação com uma cepa mutante (*P. fluorescens* CH77) deficiente para tal composto.

Da mesma forma, a produção *in vitro* de amônio pelos isolados bacterianos XT23, XT38, XT39 e XT56 pode ter contribuído de forma direta no biocontrole desses nematoide por ser um composto nematicida. Wille (2013), ao avaliar a produção de amônio sobre J2 de *M. incognita*, constatou que dos 124 isolados estudados, 54% deles foram capazes de produzir tal composto. A produção de amônia além de refletir na capacidade de biocontrole também colabora na promoção de crescimento, melhorando a nutrição das plantas (MOTA et al., 2017)

Dentre as rizobactérias estudadas, os isolados bacterianos XT21, XT23 e XT39 foram os mais promissores como agentes de biocontrole para *M. javanica* e *P. zaeae* quando aplicado via microbiolização mudas de cana-de-açúcar. Porém, 'XT38' e 'XT23' ao serem aplicados pela segunda vez (cana-soca) na interface raiz-planta, proporcionaram maiores índices de supressão de *M. javanica*, *P. zaeae* e *H. dihystra*, demonstrando que a ação destes isolados pode ser influenciada ou potencializada pela segunda aplicação. Mazzuchell e Araújo (2013), avaliando a aplicação de *Bacillus subtilis* no sulco do plantio em dois genótipos de cana-de-açúcar (SP81-3250 e RB867515) em área naturalmente infestado com os gêneros *Pratylenchus* e *Meloidogyne*, verificaram menores índices populacionais do nematoide-das-galhas nas raízes de ambas variedades, cuja infestação nas raízes reduziu em torno de 40%. No entanto, para o gênero *Pratylenchus*, não foi observada diferenças entre os tratamentos em nenhuma das variedades. De forma semelhante, Oliveira et al. (2017), demonstrou que um produto comercial a base de *Bacillus subtilis* aplicado via pulverização foliar e via tratamento de sementes do feijoeiro reduziu eficazmente as populações de fitonematoides.

Considerando as avaliações em cana-planta e em cana-soca, independentemente dos tratamentos, se nota uma relação direta entre os incrementos nos diferentes parâmetros de desenvolvimento (variáveis qualitativas e de produção) e os níveis populacionais dos nematoides. Quando analisados os dados de CT no desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar do primeiro ciclo, e cana-soca segundo ciclo, os teores de clorofilas tiveram comportamentos semelhantes diante da

aplicação dos tratamentos. Contudo, em ambos experimentos, foi possível observar que o índice de clorofila foi influenciado positivamente pelos tratamentos com XT23, XT38 e XT39. Nesse sentido, o aumento nos níveis de clorofila são de relevada importância no desenvolvimento das plantas por ser componente chave na fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2002) o que pode estar relacionado ao aumento da produtividade das diferentes culturas. Os resultados corroboram com o trabalho de Matoso (2020), o qual observou que a inoculação conjunta de cinco rizobactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Paraburkholderia tropica* e *Nitrospirillum amazonense*) sobre quatro variedades de cana-de-açúcar (RB867515; RB966928; RB106814; RB106818 e RB106819), em uma delas (RB106819) houve incremento o teor de clorofila em 35,63%.

Além do efeito direto das bactérias neste estudo no biocontrole dos nematoides, também pode estar ocorrendo indução de resistência pelo menos nos tratamentos bacterianos com XT21 e XT23. Brum (2017), avaliando esses dois isolados, verificou pequeno efeito nematicida *in vitro* sobre J2 de *M. graminicola*, no entanto, foram observados níveis de supressão da reprodução dessa espécie em arroz irrigado em mais de três vezes, atribuindo-se, tais resultados, ao aumento do nível de resistência em função da redução dos níveis de peroxidase e polifenoloxidades das plantas microbiolizadas comparativamente a testemunha sem bactérias. Em outro estudo com gramíneas, Seenivasan; David; Vivekanadan (2010) também relacionou o biocontrole de *M. graminicola* ao aumento do conteúdo de quitinase, fenóis e peroxidase em plantas de arroz tratadas com *Pseudomonas fluorescens*; porém, para a enzima peroxidases, a autora verificou relação inversa aquela verificada por Brum (2017).

Analisando-se os teores de SST nos colmos das plantas de cana-de-açúcar, previamente microbiolizadas, observou-se variação entre os tratamentos para os diferentes períodos, cujos tratamentos principalmente com XT38, evidenciaram maiores valores de graus °Brix nos colmos em cana-planta e cana-soca aos 210 e 240 DAT. No entanto, essas diferenças parecem estar mais relacionadas à precocidade de maturação, uma vez que no período subsequentes (270DAT/ D2ªAR e colheita) da amostragem, o aumento foi significativo apenas para XT38 em cana-planta. Matoso (2020), avaliando a influência de bactérias diazotróficas no teor de SST em duas cultivares de cana-de-açúcar, na colheita, verificou incremento de tal variável em uma delas, o que evidencia possíveis respostas em função do material genético inoculado.

No entanto, para o genótipo aqui avaliado (RB004387), a antecipação do corte, em cana-soca, poderia ser avaliada pensando-se em possíveis aumentos de graus °Brix aliado à produção de colmos.

Pela análise qualitativa do conteúdo de glicose e sacarose nos colmos, em cana-planta, mesmo tendo sido observado maiores concentrações de sacarose dos colmos cujas plantas foram microbiolizadas com XT21, XT38 e XT56, níveis de glicose significativamente menores foram observados apenas no tratamento das plantas com XT21. De acordo com Bellé (2018), plantas de cana de diferentes variedades inoculadas com *M. javanica* e *M. incognita* apresentaram redução no conteúdo de sacarose e consequente aumento nos teores de glicose, o que dá indícios da interferência desses nematoides na redução de açúcares, e, conseqüentemente, perdas na qualidade do açúcar e do álcool produzidos. De acordo com Fernandes (2003), tais teores elevados de açúcares redutores, constituídos por glicose e frutose, influenciam direta e negativamente a quantidade e qualidade do produto. Dessa maneira, considerando-se que o preço da tonelada da cana, na usina, varia em função dos níveis de sacarose no caldo, medias de manejo pelo uso de rizobactérias que proporcionem a redução de açúcares podem ser bem-vindas no sistema de produção de cana-de-açúcar.

Considerando-se os componentes da parede celular dos colmos, verificou-se redução significativa dos níveis de celulose nos tratamentos com XT21, XT38, XT39 e XT56, em cana-planta. No entanto, em cana-soca, apenas com XT38 tal redução se manteve, refletindo assim em menores níveis de FDA em ambas as colheitas. Semelhante às respostas para açúcares redutores, Bellé (2018) também verificou que genótipos de cana infectados com *Meloidogyne* spp. apresentaram elevados níveis de celulose, hemicelulose e lignina e de fibra bruta (FDA e FDN) nos colmos o que pode interferir negativamente na digestibilidade da cana quando utilizada como ração na alimentação animal, o que confere ao isolado XT38, mais uma característica potencial de uso na pratica.

Para a grande maioria das variáveis associadas a produção de colmos, o incremento para DC, NCP, NCPP, NCH, MFPP e MFPH com os isolados XT21 e XT38 aos 330 dias após a microbiolização, observado tanto para cana-planta e cana-soca, resultou em aumento da produtividade comparativamente ao tratamento cujas plantas não foram inoculadas (testemunhas). De acordo com Porto e colaboradores (2018), o uso do produto biológico Quartzo®, à base de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* em

canaviais comerciais do nordeste, infestados por fitonematoide, tem resultado em aumento de produtividade agrícola por hectare e redução dos níveis populacionais e *P. zaeae*. No entanto, os autores não avaliaram a eficácia desse produto no controle do nematoide-das-galhas. Da mesma forma, a importância da microbiolização de mudas com bactérias PGPR é citada por Girio et al. (2015), os quais avaliando o efeito desses micro-organismos sobre a formação de mudas de cana-de-açúcar, verificaram aumento na velocidade de brotação em função de provável sintetizar de fitorreguladores de crescimento favorecendo maiores brotações, funções essas relacionadas e discutidas no capítulo 2 dessa dissertação.

Considerando-se os benefícios das bactérias aqui testadas e avaliadas quanto ao biocontrole de fitonematoides, melhoria da qualidade do produto colhido e aumentos significativos na produção de colmos, o emprego dos isolados mais promissores podem se constituir, em futuro próximo, como uma ferramenta importante no manejo integrado de nematoides com produtos biológicos. No entanto, estudos em agrossistemas com cultivares diferentes associados a possíveis misturas de isolados ou compatibilidade de uso com fertilizantes e outros produtos químicos precisam ser realizados para implementar ou garantir seu emprego na prática.

2.8 Conclusões

Existem isolados de rizobactérias eficientes no biocontrole do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne javanica*), das lesões (*Pratylenchus brachyurus*) e espiralado (*Helicotylenchus dihystera*), os quais podem resultar no aumento do volume do caldo e da produtividade da massa fresca de colmos por unidade de área em cana-planta e cana-soca.

A microbiolização de mudas de cana com alguns isolados bacterianos resulta na melhoria da qualidade dos colmos produzidos pelos menores teores de fibra bruta, menor conteúdo de açúcares redutores, aumento dos sólidos solúveis totais do caldo e ou promoção da precocidade de maturação dos colmos.

Isolados bacterianos eficientes quanto ao biocontrole de fitonematoides, desenvolvimento das plantas e aumento da produtividade de cana-de-açúcar produzem compostos com ação promotora de crescimento e ou nematicida.

3 CAPITULO 2: Potencial de rizobacterias na produção de mudas de cana-de-açúcar

3.1 Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), é uma das gramíneas mais cultivadas no mundo (FAO, 2020) por ser uma cultura versátil e renovável, sendo fonte de matéria prima para a produção de açúcar, etanol e energia. No Brasil, a cultura se encontra estreitamente relacionada ao desenvolvimento socioeconômico por contribuir com o produto interno bruto representado 8,3 % da produção agrícola nacional (CNA, 2019), cuja estimativa da CONAB (2020) para a safra 2020/2021 previu cerca de 642,7 milhões de toneladas representando um acréscimo do 3,5% em relação à safra anterior.

Para a implantação e o êxito dos canaviais, a utilização de mudas de boa qualidade com resistência a pragas e doenças e tolerância às condições adversas (fatores abióticos), durante o estabelecimento, está diretamente relacionada a alta produtividade da cultura (ROSSETTO; SANTIAGO, 2009). Diversos estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de melhorar a adaptação das mudas às condições de campo. Nesse sentido, diferentes estratégias como o uso de ácidos húmicos (OLIVEIRA et al., 2015) e de diferentes substratos no enraizamento (PINTO et al., 2016; GAZOLA; CIPOLA FILHO; FRANCO JÚNIOR, 2017) têm sido testadas. Além disso, a utilização de micro-organismos benéficos capazes de produzir compostos e/ou moléculas relacionadas à promoção de crescimento também pode ser uma alternativa viável e com baixos riscos ambientais. Entre os micro-organismos mais utilizados, destacam-se as bactérias que apresentam a habilidade de colonizar o tecido das plantas formando relações simbióticas, endofíticas ou associativas. (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989).

Nesse contexto, bactérias isoladas das rizosferas de plantas, denominadas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas ou PGPR (Plant Growth-Promoting Rizobacteria) (KLOEPPER, 1990), vêm ganhando distinção por manifestar a capacidade de colonizar as raízes de diversas espécies vegetais na presença da microbiota natural do solo (SCHROTH; HANCOCK, 1982; SORENSEN, 1997), provocando efeitos positivos no crescimento das plantas e gerando altos rendimentos e produtividade (KLOEPPER et al., 1992; BAIS et al, 2006). Estes efeitos derivam da sínteses de diversos compostos, metabólitos e/ou enzimas produzidos pelas

rizobactérias as quais atuam de forma direta (EGAMBERDIEVA; JABBOROVA; BERG, 2016; VARGAS-RODRÍGUEZ et al., 2012) através da fixação biológica de nitrogênio (N₂), solubilização de fosforo (P), produção de sideróforos, sínteses de hormônios (auxina-ácido indolacético (AIA), citocininas e giberelinas) (VEJAN et al., 2016). Adicionalmente, tais bactérias também possuem a capacidade de adaptabilidade ou tolerâncias (pH do solo, temperatura e salinidade) a condições ambientais adversas.

Existem muitos estudos evidenciando a utilização de bactérias no desenvolvimento de mudas de diversas espécies vegetais, respaldando assim a viabilidade e a aplicação desses micro-organismos. Em trabalhos realizados por Mafia e colaboradores (2005), observaram-se que mudas de eucalipto inoculadas com rizobactérias tiveram incrementos do 52% a 69% na biomassa radicular. Da mesma forma, Gonçalves et al., (2018) verificaram que ao suplementar cepas bacterianas promotoras de crescimento em diversos substratos para a produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em fase de aclimatização, houve aumento significativo no desenvolvimento das plantas. Já em estudos desenvolvidos com cana-de-açúcar, observou-se que diversos gêneros de bactérias são responsáveis por promover o crescimento. Segundo Matoso et al., (2016) ao avaliar a influência da inoculação de cinco cepas de bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azospirillum amazonense*) sobre o desenvolvimento inicial de mudas nas variedades RB867517 e RB966928 de cana-de-açúcar, tanto o volumem como a fitomassa seca das raízes, em ambas variedades, foram superiores em relação a testemunha. Adicionalmente, Gírio et al. (2015) ao testar bactérias promotoras de crescimento na formação de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar em casa de vegetação, verificaram que aqueles tratamentos que receberam inoculação exibiram incremento na velocidade de brotação em relação aos demais. Porém, nesses estudos envolvendo a cana-de-açúcar, os micro-organismos selecionados, apesar de eficientes quanto a promoção de crescimento, apresentavam eficiência restrita sobre fatores bióticos com pragas e doenças.

Em trabalho recente conduzido por Bisognin (2017), o autor verificou que algumas rizobactérias demonstraram potencial no desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar com incremento da massa fresca da parte aérea e de raízes do

genótipo testado. No entanto, estudos quanto a capacidade desses isolados na colonização de diferentes variedades de cana-de-açúcar, não foram conduzidos.

Dessa forma, teve-se por objetivo neste estudo, avaliar os efeitos da microbiolização de três bactérias promotoras do crescimento oriundas de folhelhos pirobetuminosos (XT23, XT38 e XT39) (BRUM, 2017) e pré-selecionadas em cana-de-açúcar (BISOGNIN, 2017), sobre o desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar com bom potencial produtivo e adaptadas às condições do Rio Grande do Sul.

3.2 Material e métodos

Avaliou-se o potencial de três isolados de rizobactérias pré-selecionados como promotores de crescimento e biocontroladores do nematoide-das-galhas e das lesões (BISOGNIN, 2017, PACHECO et al. 2018) em quatro genótipos de cana-de-açúcar, cujo estudo foi conduzido nas dependências laboratório de Fitopatologia/Nematologia e em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas-RS. Para tanto o trabalho foi conduzido visando a produção de mudas pré-brotadas (LANDELL et al. 2013) em dois sistemas de irrigação.

Foram utilizados os isolados bacterianos XT23 e XT39 (*Micrococcus luteus* Schroeter) e XT38 (*Exiguabacterium acetylum* Levine & Soppeland), os quais foram multiplicados, mantidos e preservados em meio de cultura Kado 523 (KADO; HESKETT, 1970) e glicerol ao 20% (v/v) a -20 °C (MARIANO; SILVEIRA, 2005) na coleção da Embrapa Clima Temperado. Para utilização das bactérias nos ensaios, cada isolado foi primeiramente repicado em placas de Petri com meio Kado 523 (KADO; HESKETT, 1970), incubados e crescidos em BOD por 48 h a 28°C.

As variedades utilizadas nos ensaios foram RB92579, RB867515, RB008347 e RB 016416, procedentes do Programa de Melhoramento da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) em parceria com Embrapa Clima Temperado, mantidas no BAG da mesma unidade. Além de 'RB008347', genótipo onde foram selecionadas as rizobactérias (BISOGNIN, 2017), os demais materiais genéticos foram escolhidos por apresentarem resistência ao frio, a seca, maturação, boa produtividade e adaptabilidade para as condições do RS (ANJOS; SILVA, 2016; ANTUNES, 2018).

Os experimentos foram montados, sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), em delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 4x4 correspondendo a quatro variedades e aos três isolados bacterianos mais um tratamento sem adição de bactéria (água salina), com dez repetições para cada tratamento, cujo ensaio irrigado pelo sistema *floating* foi conduzido entre outubro e novembro/2019; e, por regas diárias, entre maio e julho/2020.

Para obtenção das mudas, mini-toletes de colmos maduros de cana-de-açúcar dos genótipos de aproximadamente 3,0 cm e com uma gema, foram depositados em tubetes de 150cm^3 contendo substrato esterilizado conforme sistema de produção de Landell et al., (2013) modificado cuja manutenção da umidade no solo foi feita por regas diárias conforme necessidade.

Decorridos 10 dias do plantio, cada planta brotada, mantida no tubete com substrato, foi microbiolizada com 15mL de uma suspensão bacteriana individual de cada um dos isolados bacterianos, previamente crescidos em meio Kado 523 (KADO; HESKETT,1970), cujas suspensões foram ajustadas ($\text{OD}_{540}=0,5$) em espectrofotômetro. Como testemunhas, plantas das mesmas cultivares brotadas e mantidas em tubetes com substrato, receberam 15mL de suspensão de água salina (NaCl a 0,85%).

Decorrido aproximadamente uma semana da microbiolização, 10 tubetes de cada tratamento contendo as mudas, foram transferidos para bandejas plásticas em sistema *floating* onde permaneceram por 20 dias sendo o nível da água mantido durante. Da mesma forma, mudas de 10 dias produzidas conforme mesmo procedimento e submetidas aos mesmo tratamentos, foram irrigadas diariamente conforme necessidade das plantas (substrato não saturado).

Decorridos, 15 e 22 dias da microbiolização das mudas, mantidas no sistema *floating* ou regas diárias, respectivamente, foram avaliadas quanto à altura (mm) e diâmetro do colmo (mm) por meio de um paquímetro digital e ao conteúdo de clorofila total através do Clorofilômetro portátil SPAD-502Plus. Para as avaliações da massa fresca da parte (MFPA) aérea e das raízes (MFR), cada planta foi primeiramente lavada e a seguir seccionada para pesagem em balança analítica.

Complementarmente, dados de temperatura da região de estudo, obtidos da Estação Meteorológica da Embrapa Clima Temperado, foram coletados entre junho e julho de 2019; e, entre setembro e outubro de 2020, conforme Figuras 3 e 4.

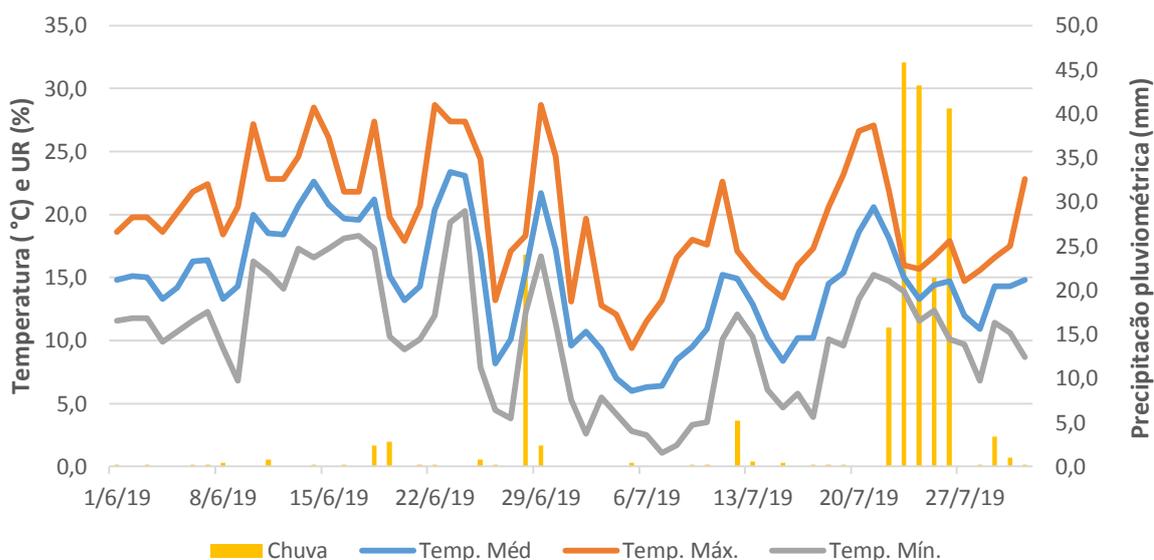


Figura 1- Dados mensais de precipitação pluviométrica, temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa do ar, Pelotas, RS-2019.

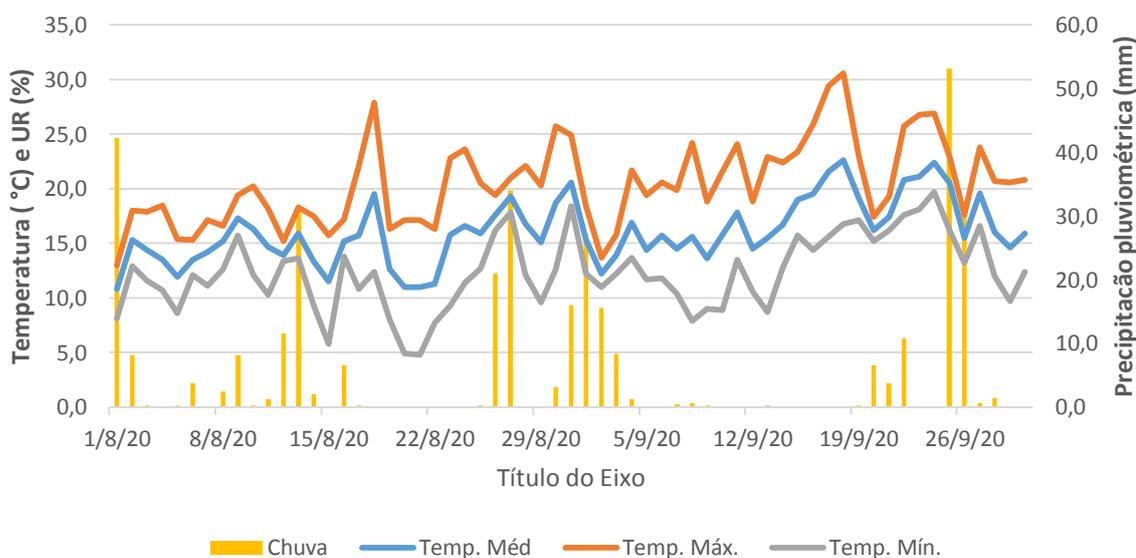


Figura 2 - Dados mensais de precipitação pluviométrica, temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa do ar, Pelotas, RS-2020.

Os dados referentes à altura final das plantas, diâmetro do colmo, conteúdo de clorofila total, e, massa fresca da parte aérea e das raízes, obtidos em cada um dos ensaios, foram submetidos a análise de variância em esquema bifatorial. A seguir, as médias dos diferentes tratamentos, foram comparadas entre si pelo teste de Duncan ao 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa SAS® (SAS 9.3. SAS Institute, Cary, North Caroline, USA).

3.3 Resultados e Discussão

Verificou-se interação significativa entre cultivares e rizobactérias para a maioria das variáveis associadas ao desenvolvimento das mudas em ambos experimentos (Tabelas 15,16,17 e 18).

3.3.1 Avaliação dos isolados bacterianos no desenvolvimento de mudas de pré-brotadas de cana-de-açúcar em sistema *floating*

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, observa-se interação significativa entre os tratamentos para as variáveis clorofila total, massa fresca da parte aérea e das raízes das mudas desenvolvidas em substrato saturado com água (*floating*) (Tabela 15). Já para diâmetro do colo e altura, as diferenças foram significativas apenas para o fator variedade, onde, independentemente do tratamento bacteriano, o genótipo RB016916 resultaram em maiores e menores valores para ambas variáveis, e, para 'RB92579', apenas a segunda (Tabela 16).

Tabela 16 - Potencial de três isolados de rizobactérias quanto a capacidade de promoção de crescimento em mudas de quatro variedades de cana-de-açúcar conforme conteúdo de clorofila total, massa da parte aérea das raízes sob sistema *floating*.

Isolados bacterianos	Clorofila total				CV(%)
	RB008347	RB016916	RB867515	RB92579	
Testemunha	32,83 Aa	27,75 Ba	30,23 Aa	27,63 Aa	20,48
XT-23	30,83 Aa	31,97 ABa	29,28 Aa	25,23 Aa	15,79
XT-38	29,34 Aa	34,76 Aa	30,10 Aa	27,60 Aa	14,97
XT-39	38,35 Aa	29,95 Bbc	31,73 Ab	24,68 Ab	14,82
CV(%)	16,28	24,99	10,37	38,63	
Massa fresca da parte aérea (g)					
Testemunha	4,99 Aa	2,88 Bb	3,38 Aa	4,10 Aa	34,89
XT-23	2,80 Bb	6,05 Aa	2,82 Ba	3,80 Ba	31,82
XT-38	4,07 Aab	5,15 Aa	3,31 Ab	4,31 Aa	31,45
XT-39	2,85 Ba	5,12 Aa	2,73 Bb	3,63 Ba	29,86
CV(%)	15,45	12,42	17,17	20,01	
Massa fresca da raiz (g)					
Testemunha	27,98 Aa	22,37 Bb	19,61 ABb	14,42 Bb	14,97
XT-23	17,12 Bb	19,81 Bab	17,33 Bb	22,49 Ba	17,19
XT-38	20,61 Ba	31,66 Aa	24,62 Aa	31,04 Aa	30,89
XT-39	18,49 Ba	20,30 Ba	19,18 ABa	20,68 Ba	16,5
CV(%)	19,34	21,57	23,43	25,96	

*Medidas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, e, médias seguidas pelas mesmas letras minúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação; Testemunha = plantas não microbiolizadas (água salina).

Na avaliação do efeito dos tratamentos bacterianos sobre o conteúdo de clorofila total (Tabela 15), para as variedades RB08347, RB867515 e RB92579, não foram detectadas diferenças significativas entre mudas tratadas com as bactérias e a testemunha. Já para RB016416, observou-se que o isolado XT38 impactou positivamente sobre tal variável em mais de 25% de aumento em sistema de produção com o solo saturado. Quando avaliada a diferença entre as cultivares dentro de cada tratamento, observou-se significância apenas a microbiolização das mudas com XT39, verificando-se maior conteúdo de clorofila nas variedades RB92579, RB867515 e RB008347.

Tabela 17- Diâmetro do colo e à altura em mudas de quatro variedades de cana-de-açúcar em sistema *floating* independentemente do isolado bacteriano testado.

Diâmetro do colo (mm)				
RB016916	RB008347	RB92579	RB867515	CV (%)
6,58 a	6,11 b	5,58 bc	5,35 c	16,35
Altura (mm)				
RB016916	RB008347	RB92579	RB867515	CV (%)
284,80 a	208,00 b	269,10 a	175,60 b	31,88

*Medidas seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação.

Para a variável massa fresca da parte aérea (MFPA) (Tabela 15), verificou-se um incremento médio de 88.90% ($P < 0,05$) para as mudas da variedade RB016416 microbiolizadas com XT23, XT38 e XT39 em comparação à testemunha. Embora o tratamento das mudas com o isolado XT38 não tenha diferido da testemunha quanto a MFPA para 'RB867515', 'RB92579' e RB008347, verificou-se que a microbiolização das mudas dessas três variedades com XT23 e XT39 resultou em redução dessa mesma variável em relação à testemunha. Muito embora tenham sido verificadas diferenças significativas entre as cultivares para essa mesma variável, no tratamento cujas mudas receberam apenas água salina (testemunha), na microbiolização com o isolado XT38, o efeito não foi significativo; para os demais tratamentos bacterianos os resultados foram variáveis.

Em relação à MFR, (tabela 15) verificou-se que as mudas das variedades RB016416 e RB92579, microbiolizadas com o isolado XT38, tiveram incrementos na massa de raízes em 115,25 e 41,52% em relação a testemunha, respectivamente. Já para 'RB8347', verificou-se redução da MFR em todos tratamentos bacterianos ($P < 0,05$); e, em RB867515, o efeito não foi significativo. Quando a avaliação de MFR foi feita dentro dos tratamentos bacterianos, embora na testemunha e no tratamento bacteriano com XT23 os genótipos RB8347 e RB92579 tenham resultado em maior valor, não se verificou diferença entre as variedades de cana quando as mudas foram microbiolizadas com XT38 e XT39.

3.3.2 Avaliação dos isolados bacterianos no desenvolvimento de mudas de pré-brotadas de cana-de-açúcar em substrato não saturado

Na avaliação da microbiolização das mudas em substrato com regas diárias (sem saturação de água), verificou-se interação significativa entre genótipos e isolados bacterianos para a grande maioria das variáveis analisadas (Tabela 18).

Tomando-se por base a altura das plantas, interações significativas entre genótipos e bactérias foram observadas onde, de uma forma geral, todos isolados promoveram crescimento. Analisando-se os dados por genótipo, em RB008347, as rizobactérias XT23, XT38 e XT39 proporcionaram incremento significativo de duas a três vezes (19 a 20cm). Da mesma forma, o genótipo da cana-de-açúcar RB92579 quando microbiolizadas com os isolados XT23 e XT38 tiveram incremento semelhante (2 a 3 vezes) para a mesma variável em relação a testemunha. Já para os genótipos RB019616 e RB867515, apenas o isolado bacteriano XT-38 mostrou efeito positivo no crescimento das mudas em resultando em aumentos de 456,82 e 96,50%, respectivamente. Por outro lado, observando-se as respostas das variedades dentro dos tratamentos (isolados bacterianos e testemunha), variedade RB92579 apresentou maior altura comparativamente as demais.

Analisando-se a altura das mudas de cana, ao longo dos 27 dias após a microbiolização, verificou-se que o isolado XT38 foi o que mais incrementou o desenvolvimento das plantas de todos os genótipos em relação aos demais tratamentos. Adicionalmente, para as variedades, RB008347 e RB92579, os isolados XT23 e XT39 também promoveram algum incremento na altura das plantas ao longo

do período de observação em sistema de irrigação em substrato não saturado com água.

Quando avaliada o conteúdo da clorofila total, embora tenha sido verificada interação significativa entre os tratamentos (Tabela 18), apenas a variedade RB92579 se desenvolveu a ponto de serem tomadas as medições do conteúdo de clorofila em todos tratamentos. Já para os demais genótipos, em RB019616 e RB008347, foi possível tomar as medidas para as mudas microbiolizadas como XT38; e, a primeira, também com XT23. Não foi possível quantificar o conteúdo clorofila na variedade RB867515 devido ao desenvolvimento exíguo do broto. Nesse sentido, analisando-se o feito das bactérias dentro das variedades, em 'RB 008347' e 'RB92579', houve incremento no conteúdo de clorofila quando as mudas foram microbiolizadas com XT38 e XT39 comparativamente a testemunha; e, em RB019616 com XT-38, sendo este o único isolado que permitiu o desenvolvimento de brotos para avaliação de tal variável. Observando-se o comportamento das variedades dentro dos tratamentos, na testemunha, não se verificou diferenças significativas entre as variedades. Por outro lado, mudas de 'RB92579' microbiolizadas com os três isolados e de 'RB008347' tratadas com XT38 e XT39 resultaram em incremento no conteúdo de clorofila.

Tabela 18- Altura, clorofila total, e, massa fresca da parte aérea e das raízes em mudas de diferentes variedades de cana-de-açúcar microbiolizadas com três isolados bacterianos submetidas a irrigação por regas diárias (substrato não saturado).

Isolados bacterianos	Altura (mm)					CV(%)
	RB008347	RB016916	RB867515	RB92579		
Testemunha	10,15 Bb	12,02 Bb	16,25 Bb	47,45 Ba		28,23
XT-23	29,12 Ab	17,98 Bbc	14,90 Bc	113,79 Aa		33,81
XT-38	39,36 Ac	66,93 Ab	22,16 Ac	93,24 a		32,94
XT-39	30,95 Ab	13,18 Bb	15,82 Bb	63,97 Ba		26,66
CV(%)	27,02	27,28	34,83	22,85		
	Clorofila total					
Testemunha	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Aa	2,6 Ba		60,91
XT-23	0,0 Bb	0,0 Bb	0,0 Ab	17,63 Aa		69,68
XT-38	2,33 Aab	11,64Aa	0,0 Ab	7,72 ABA		82,82
XT-39	3,17 Ab	0,0 Bb	0,0 Ab	5,5 Ba		89,43
CV(%)	79,82	69,66	0,00	82,89		
	Massa fresca da parte aérea (g)					
Testemunha	0,19 Ba	0,22 Ba	0,25 Aa	0,33 Ba		20,35
XT-23	0,50 ABb	0,42 Bb	0,33 Ab	0,95 Aa		32,43
XT-38	0,81 Aa	1,25 Aa	0,35 Ab	0,91 Aa		25,24
XT-39	0,31 Ba	0,28 Ba	0,25 Aa	0,50 Ba		28,98
CV(%)	27,34	28,32	27,26	32,91		

Massa fresca da raiz (g)						
Testemunha	18,27 Bab	19,98 ABa	16,37 Ab	15,72 Bb	20,76	
XT-23	19,58 ABab	21,08 Aa	16,77 Ab	19,28 Aab	16,66	
XT-38	20,90 Aa	20,69 ABa	15,52 Ab	19,59 Aa	19,52	
XT-39	19,30 ABa	17,89 Ba	16,42 Aa	16,36 Ba	17,09	
CV(%)	12,35	16,01	9,33	12,34		

*Medidas seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e, pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação; Testemunha- plantas não microbiolizadas com rizobactérias (água salina).

Para diâmetro do colo, o efeito foi significativo apenas para o fator genótipo (Tabela 18), cujas variedades RB008347 e RB016916 apresentaram os maiores valores comparativamente aos demais materiais genéticos independentemente do tratamento das mudas.

Tabela 19 - Diâmetro do colo de mudas de diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas a irrigação por regas diárias (substrato não saturado) independentemente dos tratamentos com isolados bacterianos.

Diâmetro do colo (mm)				
RB016916	RB008347	RB92579	RB867515	CV (%)
6,78a	6,38a	4,70bc	5,81c	16.32

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan a 5%; CV = Coeficiente de Variação.

Avaliando-se a influência dos tratamentos bacterianos sobre o desenvolvimento da MFPA das mudas no substrato, sob a mesma forma de irrigação (regas diárias), constatou-se influência positiva do isolado XT38 sobre os genótipos RB008347, RB019616 e RB92579 incrementando os valores de tal variável em 4,3, 5,7 e 2,8 vezes (75 a 370%) em comparação a testemunha, respectivamente. Da mesma forma, o isolado XT23 promoveu aumento significativo da MFPA de RB92579 em aproximadamente três vezes (Tabela 17). Quando avaliado a MFPA das variedades dentro dos tratamentos, os genótipos RB008347, RB019616 e RB92579 microbiolizadas com XT38, e, 'RB92579' microbiolizado com XT23, resultaram em mudas tiveram incremento nos valores dessa variável. Já nas mudas da testemunha ou do tratamento com XT39, não foi observado efeito significativo dos tratamentos ($P > 0,05$).

Em relação à MFR, mudas do genótipo RB92579 e RB008347 microbiolizadas com 'XT38' tiveram um incremento médio de 24,61 e 14,40%, respectivamente; e,

XT23 também promoveu aumento significativo da massa fresca das raízes de 'RB008347' em 22,60%. No entanto, para o genótipo RB016916 microbiolizado com XT39, verificou-se redução da MFR. Pela análise das interações, considerando-se o fator genótipo, dentro de tratamentos (Tabela 17), entre os genótipos tratados com XT23, a variedade RB92579 apresentou maiores valores de MFR. Para 'XT38', a microbiolização dos genótipos RB92579, RB016916 e RB008347 apresentaram maiores valores; e, para os tratamentos com 'XT39' e testemunha, não houveram diferenças significativas entre as variedades ($P > 0,05$).

Analisando-se os resultados obtidos para ambos sistemas de irrigação, de uma maneira geral, observou-se que os isolados XT38 e XT23 promoveram incremento no conteúdo de clorofila, MFPA e/ou da MFR na maioria dos genótipos avaliados, verificando-se um maior número de interações positivas entre bactérias e genótipos de cana para as diferentes variáveis. Especialmente XT38 parece ter se adaptado melhor quando avaliado em ambas condições de saturação d'água do substrato para as variáveis clorofila, FPA e MFR onde houve interação significativa entre os fatores. Embora a relação entre isolados bacterianos e variedades tenha variado, verificou-se que a promoção de crescimento se deu em três dos quatro genótipos avaliados.

Bisognin (2017) estudando o efeito promotor de crescimento de mudas de cana-de-açúcar da variedade 'RB008347' por diferentes isolados bacterianos, em sistema de produção com substrato não saturado, verificou que a maioria dos isolados, incluindo dois (XT23 e XT39), incrementaram o desenvolvimento das mudas pelo aumento da altura, massa fresca da parte aérea e das raízes. Da mesma forma, Gírio et al. (2015) avaliando uma mistura de cinco espécies de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicansos*) sobre a formação de mudas pré-brotadas de cana da variedade RB867515, em substrato não saturado, notaram um incremento no índice de velocidade de brotação em todos os tratamentos com essas bactérias. Em outro estudo com bactérias diazotróficas utilizando-se o inoculante AzoTotal® associado a adubação nitrogenada, Gonçalves et al., (2020) verificaram melhoria no desenvolvimento de mudas da variedade RB867515. No entanto, quando as mudas foram submetidas apenas à microbiolização com a bactéria, verificou-se efeito negativo.

Segundo, Bisognin (2017), a promoção de crescimento das mudas de cana, também verificada nesse estudo, pode estar associada às ações diretas produzidas

pelas rizobactérias que envolvem a produção de diferentes fitorreguladores. Estes efeitos foram observados por Brum (2017) no patossistema arroz irrigado x *Meloidogyne graminicola* x rizobactérias. Nesse estudo, o autor verificou que o isolado XT23 de *Micrococcus luteus* produziu elevados níveis de auxina *in vitro*, o que pode ter estimulado o crescimento de plantas cujas sementes foram microbiolizadas com essa rizobactéria. Do mesmo modo, em estudo conduzido por Silveira et al. (2018) com 13 bactérias endofíticas provenientes de cana-de-açúcar, verificou-se que todos os isolados foram capazes de produzir auxinas (ácido-indol-acético - IAA), além de solubilizarem fosfato e produzirem sideróforos. Por outro lado, Cipriano et al. (2021), avaliando o desempenho de seis inoculantes bacterianos (*Paraburkholderia caribensis*, *Kosakonia radicincitans*, *Paraburkholderia tropica*, *P. tropica*, *Pseudomonas fluorescens* *Herbaspirillum frisingense*) no desenvolvimento inicial de mudas de cana-de-açúcar, verificaram influência positiva desses isolados na absorção e acúmulo de nutrientes, demonstrando que tais cepas avaliadas possuem um conjunto de mecanismos que melhoram a capacidade de absorção de nutrientes.

Da mesma forma, Pereira e colaboradores (2013), analisando o acúmulo de massa fresca após a inoculação de bactérias diazotróficas (*H. rubrisubalbicans*, *H. seropedica* e *Burkholderia gladioli*), em seis variedades comerciais de cana-de-açúcar (RB867515, RB72454, RB92579, RB918639, RB92606 e RB855536), constataram que a inoculação de *B. gladioli* promoveu maior acréscimo da biomassa apenas em um (RB72454). Semelhantemente, Ribeiro et al. (2015) ao avaliar *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *B. tropica* e *Azospirillum amazonense* sobre o desenvolvimento de plantas da variedade RB966928, verificaram maior acúmulo na massa fresca da parte aérea e massa seca das mudas inoculadas com *H. seropedicae* e *B. tropica*. Em outro estudo, Santos (2017), ao testar os efeitos das bactérias *Bacillus subtilis* e *B. pumilus*, sobre mudas de cana, pré-brotadas observou ganhos da biomassa seca da parte aérea e massa seca da raiz, com destaque para o *B. subtilis*. Por outro lado, Marques Júnior et al., (2008) inoculando *H. seropedicae*, evidenciaram acentuada promoção do crescimento radicular em microtoletes de cana tratados termicamente, promovendo um incremento de massa ao redor de 120%; no entanto, os autores não mencionaram o tipo de irrigação empregado no ensaio.

Os resultados de maior acumulação na massa fresca da parte aérea e radicular, ademais de maior altura das mudas de cana-de-açúcar, provavelmente se devam

principalmente a produção de auxinas aos isolados aqui testados conforme já verificada para XT23 (BRUM, 2017) e XT39 de *Micrococcus luteus* para o presente estudo (Capítulo 1). Este fitormônio está relacionado com a formação das raízes, melhorando a absorção de nutrientes (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016) e contribuindo para o acúmulo de massa. Adicionalmente, a produção de sideróforos verificada para o isolado XT23 pode ter repercutido positivamente no incremento da MFPA e MFR para RB016916 e RB92579 nas duas condições de irrigação; e, para MFPA em RB16916 e RB92579 em irrigação por regas diárias e *floating*, respectivamente. De acordo com Bashan; Kamnev; de-Bashan, (2013), a produção de sideróforos contribui com o sequestro da maioria de íons férricos disponíveis, facilitando o crescimento da planta, além de prevenir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico (PAYNE, 1994; MASEPOHL, 2017). Além do incremento da MFPA e do conteúdo de clorofila observado nas mudas de cana de 'RB016916' microbiolizadas com 'XT39', esse isolado solubiliza potássio (BISOGNIN, 2017), o que pode ter favorecido o desenvolvimento das plantas (DALCIN, 2008).

Apesar dos incrementos na MFPA e MFR das mudas microbiolizadas em ambos experimentos, os efeitos observados variaram em função do sistema de irrigação. Essas diferenças foram também observadas por Belimov et al. (2015), que estudando o efeito de duas estirpes bacterianas (*Achromobacter xylosoxidans* CM4, e *Variovorax paradoxus* 5C-2) produtoras de auxina, sobre os rendimentos de tubérculos de batata expostas a diferentes a duas condições de umidade do solo (80 e 40% cc), observaram que a inoculação das rizobactérias em plantas com maior gradiente de umidade acelerou o desenvolvimento vegetativo inicial das plantas com o isolado CM4 comparativamente ao controle (tratamento sem inoculação de bactéria). Adicionalmente, a irrigação deficitária reduziu significativamente a produção de tubérculos em 25% para ambos isolados.

O incremento no conteúdo de clorofila observado para os genótipos RB019616 e RB92579 com rizobactérias foi também observado por Bisognin (2017) em mudas de cana microbiolizadas com os isolados XT,51, P17, XT37, XT23, XT39, e XT 56. De acordo Martuscello et al., (2009), o incremento do teor de clorofila está relacionado ao estado nutricional da planta refletindo na concentração de nitrogênio o qual indicativo da produção da cultura.

No presente estudo observou-se que as variedades RB008347 e RB867515 manifestaram um desenvolvimento mais lento no experimento com irrigação por

floating, cujo comportamento pode ser atribuído à baixa temperatura durante o período de condução do trabalho (Figura 2).

No bioensaio irrigado por *floating*, observou-se que apenas a variedade RB008347 apresentou incremento da biomassa em todos os tratamentos bacterianos. Porém, as variedades RB19616, RB867515 e RB92579 verificou-se decréscimo da massa fresca da parte aérea e das raízes quando as mudas foram inoculadas com os isolados XT23 e XT39. Este efeito antagônico também foi observado por Pereira et al. (2013), que ao avaliarem a matéria seca de colmos de plantas das variedades RB86751' e RB9257, inoculadas com algumas estirpes da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedica*, observaram menor acúmulo de biomassa. Resultados semelhantes foram reportados por Chaves et al., (2015) que analisando os acúmulos da massa seca de parte aérea e de raízes de 'IACSP95-5000' e 'RB867515' sob inoculação mista e individual com os isolados Gd-BR11281T, Hr-BR11504 e Hs-BR11335 de diferentes bactérias diazotróficas, verificaram que ambas variedades exibiram comportamento diferenciado durante a fase de brotação, e; o desenvolvimento da parte aérea estava relacionado ao o genótipo inoculado, confirmando os resultados obtidos neste estudo. De acordo com Grayston et al., (1998), as plantas são capazes de liberar uma diversidade de compostos orgânicos, os quais variam segundo a espécie e inclusive dentro do mesmo cultivar (LUGTENBERG; KRAVCHENKO; SIMONS, 1999) expressando uma interação específica entre a planta e o micro-organismo (REIS et al., 2000)

De forma geral, a microbiolização das mudas de cana-de-açúcar com das rizobactérias XT23 e XT38 expressou características promissoras de promoção de crescimento sob condições controladas, favorecendo o desenvolvimento principalmente da massa fresca da parte aérea e de raízes para a variedade RB92579, favorecendo, desta maneira, a adaptação e estabelecimento das mudas a campo e assim, podendo incrementar os ganhos na produtividade. Porém, deve-se levar em conta a interação entre isolados e sistema de irrigação conforme verificado neste estudo. Nesse sentido, trabalhos adicionais com a mistura de isolados poderiam dar respostas a essas lacunas e melhorarem o desempenho de uma forma geral, conforma já observado em outros estudos. Da mesma forma, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento frente aos demais cultivares podem auxiliar na melhoria dessa estratégia no processo de formação de mudas contribuindo para todo sistema de produção da cana-de-açúcar.

Ademais, o registro de produtos que envolvam promoção de crescimento e controle biológico pode ser uma realidade para a futura oferta de produtos biológicos registrados no mercado com baixo risco toxicológico e ambientalmente sustentável.

3.4 Conclusões

Existe interação entre cultivares de cana-de-açúcar e sistemas de irrigação para os diferentes isolados de rizobactérias no processo de produção de mudas. Embora a microbiolização das plantas com rizobactérias seja efetiva quanto ao incremento da massa fresca da parte aérea e das raízes; no entanto, dependendo do isolado, e da interação, o desenvolvimento das mudas pode ser afetado negativamente.

4 Conclusões Gerais

Existem isolados de rizobactérias das espécies *Arthrobacter pascens* e, *Micrococcus luteus* e *Exiguobacterium acetylium* são eficientes quanto ao biocontrole de fitonematoides e capazes de promoverem incrementos no desenvolvimento de mudas e de plantas e na produtividade da cultura em cana-planta e ou cana-soca.

Alguns isolados de rizobactérias podem resultar em aumentos do teor de sacarose e menor conteúdo de açúcares redutores no caldo; e, maiores níveis de digestibilidade das fibras nos colmos; assim como também estão relacionados a promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar, cujo desenvolvimento das plantas varia com a interação: variedade e isolado bacteriano.

5 Referências Bibliográficas

AGROFIT (2021). Sistema de agrotóxicos fitossanitários. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 09 de março de 2021.

ANJOS, I. A. dos; SILVA, D. N.; CAMPANA, M. P. Cana-de-açúcar como forrageira. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: IAC. p.725-745, 2008.

ANTUNES, W.R. **Baixas temperaturas nas características agronômicas, produtividade e qualidade em genótipos de cana-de-açúcar, no estado do Rio Grande do Sul**. 2018. 93 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Sistemas de Produção Agrícola Familiar), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

BACCHI, O.O.S. Botânica da cana-de-açúcar. In: ORLANDO FILHO J., Coord. **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, (Coleção PLANALSUCAR, 2), p.25-37,1983.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p.233-266. 2006.

BAKKER, A.W.; SHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19 p. 451–457, 1987.

BARROS, A.C.B. **Estudos sobre o uso do nematicida sistêmico Terbufos em cana-de-açúcar: avaliações na cana planta**. (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2000.

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

BASHAN, Y.; KAMNEV, A.A.; DE BASHAN, L.E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils**, v.49, p. 465-479, 2013.

BELIMOV, A.A.; DODD, I.C.; SAFRONOVA, V.I.; SHAPOSHNIKOV, A.I.; AZAROVA, T.S.; MAKAROVA, N.M.; DAVIES, W.J.; TIKHONOVICH, I.A. Rhizobacteria that produce auxins and contain 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase

decrease amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*). **Annals of Applied Biology**, v. 167, p. 11-25, 2015.

BELLÉ, C. **Fitonematoides na cultura da cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul levantamento, caracterização e reação de genótipos a *Meloidogyne javanica* *Pratylenchus zaei***. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Agricultura Ambiente) - Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, 2014.

BELLÉ, C. **Diversidade, agressividade e patogenicidade de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar e prospecção da resistência genética em genótipos adaptados ao sul do Brasil**. 2018. 155 f. Tese (Doutorado em Fitossanidade: Fitopatologia) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2018.

BELLÉ C.; KULCZYNSKI, S. M.; GOMES, C. B.; KUHN, P. R. Fitonematoides associados à cultura da cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul, Brasil. **Nematropica**, v. 44, p. 207-217, 2014.

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

BERINI, F.; KATZ, C.; GRUZDEV, N.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTI, G.; MARINELLI, F. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, v.36, p.818-838, 2018.

BERRY, S.D.; FARGETTE, M.; SPAULL, V.W.; MORAND, S.; CADET, P. Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaei*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, n.3, 168-176, 2008.

BISOGNIN, A.C. **Caracterização morfológica e agressividade de populações de *Pratylenchus* spp. do Rio Grande do Sul em cana-de-açúcar e manejo de fitonematoides na cultura pelo emprego de rizobactérias**, 2017. 93f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, 2017.

BLAIR, B.; STIRLING, G.R.; WHITTLE, P. Distribution of pest nematodes on sugarcane in south Queensland and relationship to soil texture, cultivar, crop age and region. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 39, p. 43-49, 1999.

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.

BRUM, D. de. **Fitonematoides nas culturas do arroz irrigado e do morango: biocontrole, promoção de crescimento, agressividade de populações e reação de cultivares**. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade: Fitopatologia) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2017.

CADET, P. Evolution des nematodes ectoparasites dans la rhizosphère de la canne à sucre au Burkina Faso. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, Montrouge, v. 23, n. 2, p. 205-213. 1986.

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

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35-44, 2001.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MONTEIRO, J. da M. dos S; SILVA, U.C.; GOMES, G. Gênero Meloidogyne: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores 126 SCAR. In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas: Millennium Editora, 2016. Cap.3, p.47-72.

CASTILLO, P.; VOVLAS, N. **Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnóstico, Biología, Patogenicidad y Manejo**. BRILL, 2007.

CASTRIC, P.A; Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.21, n.5, p.613 - 618. 1975.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Botânica**. In: CESNIK, R.; MIOCQUE, J. (Ed.), Melhoramento da cana-de-açúcar. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 37-38.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; MELO, L. J. O. Efeito de carbofuran, torta de filtro e variedades sobre a densidade populacional de fitonematoides em áreas com mau desenvolvimento da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, v. 28, p. 101-103, 2004.

CHAVES, V.A.; SANTOS, S.G. DOS; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J.S.; MONTEIRO, R.C.; REIS, V.M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1595–1602, 2015.

CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.32, n.1, p.117-121, 2000.

CIPRIANO, M.A.P.; FREITAS-IÓRIO, R. DE P.; DIMITROV, M.R.; ANDRADE, S.A.L.; KURAMAE, E.E.; SILVEIRA, A.P.D. Plant-growth endophytic bacteria improve nutrient use efficiency and modulate foliar N-metabolites in sugarcane seedling. **Microorganismos**, v. 9, n. 3, p. 479, 2021.

CNA. CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Pecuária é destaque no Valor Bruto da Produção (VBP) de 2019**. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/boletins/pecuaria-e-destaque-no-valor-bruto-da-producao-vbp-de-2019>. Acesso em: 10 jan. 2021.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2020**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em: 06 jan. 2021.

DALCIN, G. **Seleção de microrganismos promotores da disponibilidade de nutrientes contidos em rochas, produtos e rejeitos de mineração**. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. **Taxonomy and evolution**. In: HEINZ, D. J. (Ed.). Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam: Elsevier, 1987.

DE VRIEZE, J. The littlest farmhands. **Ciencia**, v. 349, n. 6249, p. 680–683, 2015.

DECRAEMER, W.; HUNT, D.J. Structure and classification. **Plant Nematology**. p.3–32, 2006. CABI. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1854/LU-1148336>>. Acesso em: 4/8/2020.

DILLEWIJN, C. **Botany of sugarcane**. Waltham: Chronica Botanica, 1952. 371 p.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GIL, M.A.; MENEGATTI, C.C. Danos causados por nematóides a variedades de cana-de-açúcar em cana planta. **Nematologia Brasileira**, v. 27, n.1, p. 69-74, 2003.

DINARDO-MIRANDA, L.L. **Nematoides e pragas da cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Biológico, 2014.

EGAMBERDIEVA, D.; JABBOROVA, D.; BERG, G. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. **Plant Soil**, v.405, p.35-45, 2016.

FAHY, P.C.; PRESLEY, G.J. 1983. **Plant bacterial diseases - a diagnostic guide**. Academic Press, San Diego, 393p.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação: FAO no Brasil. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/pt/>>. Acesso em: 2/3/2021.

FARROW, J.A., WALLBANKS, S.Y.; COLLINS, M.D. Phylogenetic interrelationship of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurthia*, and *Planococcus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.74-82, 1994.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. Piracicaba: STAB, 2003. 240p.

FERRAZ, L.C.C.B; BROWN, D.J.F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma Editora, p. 251, 2016.

GAZOLA, T.; FILHO, M. L. C.; JÚNIOR, N. C. F. Avaliação de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar provenientes de substratos submetidos a adubação química e orgânica. **Científica**, v. 45, n. 3, p. 300–306, 2017.

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

GOEBEL, J.G.S.; MACHADO-CALSIN, C.P.; MANSKE, G.M.; GOMES, C.B. Efeito promotor de crescimento e biocontrolador do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* sp. 0) por rizobactérias em plantas de azevém. **Anais... XXVIII Congresso de Iniciação Científica**, Pelotas, RS. 2019.

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

GONÇALVES, J.S.; MUNIZ, N.P.; SOUZA, E.H.; SOUZA, F.V.D.; SILVA, H.S.A. Crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em substratos suplementados com rizobactérias produtoras de ácido indolilacético, **Boletim de**

Pesquisa e Desenvolvimento 92, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, 2018.

GONÇALVES, M.C.; SILVA, K.C.; OLIVEIRA, C.E.S. STEINER, F. Nitrogênio e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar. **Colloquium Agrariae**, v.16, n.2, p.72-81, 2020.

GONZAGA, V. **Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação *in vitro* das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil**. 2006. vii, 78 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192–195, 1951.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J.N.; DHANDHUKIA, P.C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v.2, p.1-9, 2016.

GRAYSTON, S.J; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, n.3, p.369-378, 1998.

HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, S. T.; GHEYSEN, G. Functional roles effectons off plant-parasitic nematodes. **Gene**, Amsterdam, v 492, n. 1, p. 19-31, 2012

HELLER, E.; BISOGNIN, A.C.; BELLE, C.; PACHECO, D.R.; MOCCELLIN, R.; KULCZYNSKY, S.M.; GOMES, C.B. Potencial de rizobactérias no biocontrole do nematoide-das-lesões (*Pratylenchus zeae*) e na promoção de crescimento de cana-de-açúcar. **Anais... 35º Congresso Brasileiro de Nematologia**, Bento Gonçalves, RS. 2018. p.124.

HOLANDA, S.B. **Raízes do Brasil**. 26a. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 1995.

HUANG, Y.; TAO, S.; CHEN, Y. The role of arbuscular mycorrhiza on change of heavy metal speciation in rhizosphere of maize in wastewater irrigated agriculture soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 17, n. 2, p. 276–280, 2005.

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

INOMOTO, M. M. **Chega de nematoide na cana**. O Multiplicador - Edição Especial, p.2-8. 2016.

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

JUNAID, J.M.; DAR, N.A.; BHAT, T.A.; BHAT, A.H.; BHAT, M.A. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. **International Journal of Modern Plant & Animal Sciences**, v.1, n.2, p.39-57, 2013.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.-969-976, 1970.

KAWANOBE, M.; MIYAMARU, N.; YOSHIDA, K.; KAWANAKA, T.; TOYOTA, K. A field experiment with nematicide treatment revealed potential sugarcane yield loss caused by plant-parasitic nematodes in Okinawa, Japan. **Japanese Journal of Nematology**, v.46, n.1, p.9-16, 2016.

KAWANOBE, M.; TOYOTA, K.; FUJITA, T.; HATTA, D. Evaluation of nematicidal activity of fluensulfone against non-target free-living nematodes under field conditions. **Agronomy**, v.9, n.12, p.853, 2019.

KLOEPPER, J.W. **Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents**. In: Soil Microbial Technologies Applications in Agriculture. Forestry and the Environment. New York.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends Biotechnol**, v.7, p.39-43, 1989.

KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., McINROY, J.A.; YOUNG R.W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and rootknot (*Meloidyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, v.139, p.74-84, 1992.

LAMBERTI, F.; ROCA, F. SHARMA, R.D.; PIMENTEL, J.; AGOSTINELLI, A.; ANTONIO, H.; LORDELLO, R.R.A. On the occurrence of *Xiphinema* in Brazil. **Nematologia Brasileira**, v.11, p. 286-291, 1987.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. **Documentos IAC**, v. 109, 16 p., 2013.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, E. STACKEBRANDT, and M. GOODFELLOW (ed.), Chichester, United Kingdom, 1991.

LIAN, L. H.; TIAN, B.Y.; XIONG, R.; ZHU, M.Z.; XU, J.; ZHANG, K.Q. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 262–269, 2007.

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

LUGTENBERG, B.J.J.; KRAVCHENKO, L.V.; SIMONS, M. Tomato seeds and root exudates sugars: composition, utilizations by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. **Environmental Microbiology**, v.1, p.439-445, 1999.

MACHADO, V.; BERLITZ, D.L.; MATSUMURA, A.T.S.; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M.E.; FIUZA, L.M. Rizobactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. **Oecologia Australia**, v. 16, n. 2, p. 65–182, 2012.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E.M.; ZARPELON, T.G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, pág. 843–851, 2005.

MAI, W.F.; MULLIN, P.G. **Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera**. 5. ed. Nova York: Cornell University Press Ithaca, 1996. 277p.

MARANHÃO, S.R.V.L.; PEDROSA, E.M.R.; GUIMARÃES, L.M.P.; CHAVES, A.; LEITÃO, D.A.H.S.; VICENTE, T.F.S. Nematode abundance and diversity in sugarcane fields in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.43, p.485-498, 2018.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2 ed. Recife: UFRPE, p. 184, 2005.

MARQUES JÚNIOR, R.B.; CANELLAS, L.P.; SILVA, L.G.; OLIVARES, F.L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas y bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1121–1128, 2008.

MARTUSCELLO, J.A.; JANK, L.; GONTIJO NETO, M.M.; LAURA, V.A.; CUNHA, D.N.F.V. Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1183-1190, 2009.

MASEPOHL, B. **Modern topics in the phototrophic prokaryotes: Metabolism, bioenergetics and omics**. Springer: Cham. 2017.

MATOS, D.S.S.; PEDROSA, E.M.R.; GUIMARÃES, L.M.P.; RODRIGUES, C.V.M.A. BARBOSA, N., M.R. Relações entre a nematofauna e atributos químicos de solo com vinhaça. **Nematropica**, v.41, n.1, p. 28-38. 2011.

MATOSO, E..S. **Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e produção da cana-de-açúcar**. 2020. 179 f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2020.

MATOSO, E.S.; MARCO, E.D.; BELLÉ, C.; RODRIGUES, T.A.; SILVA, S.D.A. Desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa - Congrega Urcamp**, v. 0, n. 0, pág. 412–434, 2016.

MAZZUCHELLI, R.C.L; ARAUJO, F.F. Controle de fitonematoides por *Bacillus subtilis* em cana-de-açúcar. **Coloquio Agrariae**, v. 9, n. Especial, p. 29–35, 2013.

MAZZUCHELLI, R.C.L.; MAZZUCHELLI, E.H.L.; ARAUJO, F.F. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. **Control biológico**, v. 143, p. 1-6, 2020.

McCORMICK, A.J.; CRAMER, M.D.; WATT, D.A. Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 17, p. 1817–1829, 2008.

MITCHUM, M.G.; HUSSEY, R.S.; BAUM, T.J.; WANG, X.; ELLING, A.A.; WUBBEN, M.; DAVIS, E.L. Nematode effector proteins: an emerging paradigma of parasitism. **New Phytologist**, v.199, p.879-894, 2013.

MOTA, M.S.; GOMES, C.B.; SOUZA JÚNIOR, I.T.; MOURA, A.B. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion, determination and validation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 62–70, 2017.

MOURA, A.M., SILVA, E.G.; LIMA, R.F. Ocorrência dos nematoides *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 101-103. 2000.

MOURA, R.M.; MACEDO, M.E.A. Efeito da aplicação de Carbofuran em populações de fitonematoides ecto e endoparasitas da cana-de-açúcar e no desenvolvimento de cana-planta. **Nematologia Brasileira**, v. 20, p. 73, 1997.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-80, 1944.

NORTON D.C., NIBLACK T.L. Biology and ecology of nematodes W.R. Nickle (Ed.), **Manual of Agricultural Nematology**, Marcel Dekker, Inc, New York (1991), pp. 47-72.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 197, 2017.

OLIVEIRA, G.R.F.; SILVA, M.S.; PROENÇA, S.L.; BOSSOLANI, J.W.; CAMARGO, J.A.; FRANCO, F.S.; SÁ, M.E. Influência do *Bacillus subtilis* no controle biológico de nematoides e aspectos produtivos do feijoeiro. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 11, n. 1, p. 47–58, 2017.

OLIVEIRA, H.P.; MELO, R.O.; BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; ALMEIDA, D.D. Desempenho inicial de cana-de-açúcar provenientes de mudas pré-brotadas em resposta a ácidos húmicos isolados de esterco bovino. **Anais... Congresso Brasileiro De Solos**, 35, Natal, Agosto 2015.

OOSTENBRINK, M. **Major characteristics of the relation between nematodes and plants**. Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen v.66, p.1- 46. 1966.

PACHECO, D.R.; MOCCELLIN, R.; HELLER, E.; HAUBERT, M.; BELLÉ, C.; GOMES, C.B. Promoção de crescimento e redução de danos associados a *Meloidogyne graminicola* em azevém por rizobactérias. **Anais... 35º Congresso Brasileiro de Nematologia**, Bento Gonçalves, RS, p.121, 2018.

PADGHAM, J.L.; SIKORA, R.A.; Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 971–977, 2007.

PAGANS, E.; FONT, X.; SANCHEZ, A. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: Abatement by biofiltration. **Journal of Hazardous Materials**, v. 131, n. 1–3, p. 179–186, 2006.

PAGE, A.P. The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. In: KENNEDY, M.W.; HARNETT, W. **Parasitic Nematodes**. CABI, St. Albans, UK. 2001. p. 167-193.

PAYNE, S.M. Detection, isolation and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 329-344, 1994.

PEDROSA, E.M.R.; MOURA, R.M.; SILVA, E.G. Respostas de genótipos de *Phaseolus vulgaris* a meloidoginoses e alguns mecanismos envolvidos na reação. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.2, p.190-196, 2000.

PEREIRA, W.; LEITE, J.M.; HIPÓLITO, G. DE S.; SANTOS, C.L.R. DOS; REIS, V.M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 363–370, 2013.

PINTO, E.V.L.; SPÓSITO, H.N.T.; GODINHO, M.M.A.; MARTINS, B.F. Produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar em função de diferentes substratos. **Coloquio Agrariae**, v. 12, p. 93–99, 2016.

PORTO, A.C.F. PEDROSA, E.M.R., GUIMARÃES, L.M.P., OLIVEIRA, W.J. Manejo de fitonematoides em cana-de-açúcar. **Anais... 35º Congresso Brasileiro De Nematologia**, Bento Gonçalves, RS, p.27-31, 2018.

PRADO JÚNIOR, C. **História Econômica do Brasil**. 1º edição de 1945. São Paulo: Brasiliense, 1995.

RADWAN, M.A.; FARRAG, S.A.A.; ABU-ELAMAYEM, M.M.; AHMED, N.S. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. **Applied Soil Ecology**, v.56, p.58-62, 2012.

RAZA, W.; YOUSAF, S.; RAYER, F.U. PGPR activity of volatile organic compound produced by biocontrol strains. **Science Letter**, v.4, n.1, p.40-43, 2016.

REIS JR., F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, p. 985 – 994, 2000.

REIS, V. M.; SANTOS, P. E.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

RESÉNDEZ, A.M.; MENDOZA, V.G.; CARRILLO, J.L.R.; ARROYO, J.V.; RIOS, P.C. Rizobactérias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v.20, p.68-83, 2018.

RODRIGUES, C.V.M.A.; PEDROSA, E.M.R.; OLIVEIRA, A.K.S.; LEITÃO, D.A.H.S.; BARBOSA, N.M.R.; OLIVEIRA, N.J.V. Vertical distribution of nematode communities associated with sugarcane. **Nematropica**, v.41, n.1, p. 5–11, 2011.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas – Fundamentos**. Viçosa - MG: UFV, p.296, 2007.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. **Cana de Açúcar**. 2009. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-deacucar/arvore/CONTAG01_98_22122006154841.html>. Acesso em 01 jun. 2021.

SANTOS, R.M. **Avaliação do desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar promovido por inoculantes bacterianos e adubação com subprodutos**. 2017. 56f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. St. Paul: The American Phytopathology Society, 2001. 373p.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v. 216, n. 4553, p. 1376-1381, 1982.

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, 2016.

SEENIVASAN, N.; DAVID, P.M.M.; VIVEKANANDAN, P. Population dynamics of rice nematodes under a system of rice intensification. **Nematologia Mediterranea**, v. 38, p.159-163, 2010.

SENGER, C.C.D.; KOSLOSKI, G.V.; SANCHEZ, L.M.B.; MESQUITA, F.R.; ALVES, T.P.; CASTAGNINO, D.S. Evaluation of autoclave procedures for fibre analyses in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p.169-174, 2008.

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

SEVERINO, J.J.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; TESSMANN, D.J.; SOUTO, E.R. Identificação de populações de *Meloidogyne* spp. parasitas da cana-de-açúcar na região Noroeste do Paraná pelo fenótipo da isoenzima esterase. **Nematologia Brasileira**, v. 32, p. 206-211, 2008.

SHER, S. A. Revision of the Hoplolaiminae (Nematoda). VI. *Helicotylenchus* Steiner, 1945. **Nematologica** 12:1-56. 1966.

SIAMIG. Cana-de-açúcar ganha novas soluções para o controle dos nematoides - Siamig. Disponível em: <<http://www.siamig.com.br/noticias/cana-de-acucar-ganha-novas-solucoes-para-o-controle-dos-nematoides>>. Acesso em: 7/5/2021.

SIDDIQUI, I.A.; SHAIKAT, S.S.; SHEIKH, I.H.; KHAN, A. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 641–650, 2006.

SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. **Bioresource Technology**, v. 69, n. 2, p. 167–179, 1999.

SIKORA, R.A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Rijksuniversiteit Faculteit Landbouwwetenschappen, Gent. **Anais...**, 1988. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE8901435>>. Acesso em: 4/8/2020.

SILVA, S. D. DOS A. E, MONTERO, C. R. S.; SANTOS, R. C.; NAVA, D. E.; GOMES, C. B.; ALMEIDA, I. R. **Sistema de produção da cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil. 2016. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1076589/sistema-de-producao-de-cana-de-acucar-para-o-rio-grande-do-sul>. 23 out. 2019.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. La respuesta del desarrollo del dosel de la caña de azúcar al estrés hídrico. **Investigación de cultivos de campo**, v. 98, n. 2-3, p. 91–97, 2006.

SORENSEN, J. **The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms**. In: ELSAS, J.D.V.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. Modern Microbiology. New York, 1997, p.21-45.

SREENIVASAN, T.V.; AHLOOWALIA, B.S.; HEINZ, D.J. Cytogenetics. In: HEINZ, D.J. **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier, Amsterdam. 1987. p. 211-253.

STARR, J.L.; BENZEDU, I.F. Ectoparasitos nematodes. In: STARR, J.L., COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.) **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. Wallingford. CABI Publishing. 2002. p.229-239.

STIRLING, G.R.; BLAIR, B. Nematodes. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A. ; COMSTOCK, J.C. ; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. (ed). **A Guide to Sugarcane Diseases**. CIRAD Publications Service, Montpellier - France, p. 299–305, 2000.

SUBEDI, P.; GATTONI, K.; LIU, W.; LAWRENCE, K. S.; PARK, S.W. Current utility of plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents towards plant-parasitic nematodes. **Plants**, v. 9, n. 9, p.1167, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal** Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2004.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, p.473, 2000.

TIMPER, P. Conserving and enhancing biological control of nematodes. **Journal of Nematology**, v.46, n.2, p. 75-89, 2014.

VALLE-LAMBOY, S.; AYALA, A. Evaluation of four nematicides for the control of phytoparasitic nematodes on sugarcane. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 64, n. 3, p. 348–356, 1980.

VAN HEERDEN, P. D. R.; EGGLESTON, G.; DONALDSON, R. A. **Ripening and postharvest deterioration**. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Eds.). Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology. Iowa: WileyBlackwell. 2014. p. 55-84.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ, B. A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

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**, 104f. 2013. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

APÊNDICE A - Morfometria de 20 fêmeas de *Pratylenchus* sp. provenientes de amostras coletadas na área experimental com cana-de-açúcar da Embrapa Clima Temperado-Pelotas-RS.

Espécimes	CE (µm)	L (µm)	V (%)	a	b	c	c'
Z1	14,68	422,22	69,42	20,33	4,60	16,92	1,92
Z2	13,65	417,89	71,15	20,97	4,52	16,80	1,92
Z3	13,79	455,12	70,64	20,86	5,47	16,82	1,97
Z4	14,98	372,33	70,96	20,79	4,82	14,18	2,28
Z5	14,45	338,93	75,58	20,54	4,75	14,31	2,37
Z6	17,2	526,61	72,34	20,59	5,41	17,78	1,92
Z7	16,79	452,79	71,74	22,83	4,59	20,50	2,04
Z8	19,84	498,53	73,54	19,53	4,48	11,89	2,76
Z9	17,24	427,58	70,41	23,03	4,13	12,94	2,93
Z10	17,19	510,86	70,40	21,69	5,13	19,47	1,99
Z11	17,63	418,09	69,43	21,15	4,20	9,26	3,25
Z12	16,83	453,16	69,69	19,13	4,99	13,21	2,63
Z13	17,04	366,13	75,26	21,04	4,67	14,48	2,29
Z14	16,79	405,53	73,48	23,15	5,43	17,56	2,19
Z15	17,15	505,29	70,13	23,73	5,34	19,80	2,10
Z16	13,32	539,95	72,33	24,54	4,12	16,95	2,50
Z17	15,48	330,87	67,29	18,66	4,67	13,63	2,17
Z18	17,4	489,66	71,60	25,48	5,34	12,00	3,09
Z19	17,76	500,66	68,48	20,77	6,68	16,22	2,10
Média	16,27	443,80	71,26	21,52	4,91	15,51	2,34
Amplitude	13,65-19,84	338,93-539,95	67,29 – 75,26	18,66-25,48	4,12-6,68	12,0 -20,50	1,92 - 3,25

L = Comprimento do corpo, **CE** = Comprimento do estilete, **V (%)**= Distância da extremidade anterior à vulva, como porcentagem do comprimento total do corpo, **a** = Comprimento do corpo dividido pela maior largura, **b** = Comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago, **c** = Comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda, **c'** = Comprimento da cauda dividido pela maior largura na região anal.

Apêndice B - Morfometria de 20 fêmeas de *Helicotylenchus* sp. provenientes de amostras coletadas na área experimental com cana-de-açúcar da Embrapa Clima Temperado-Pelotas-RS.

Espécimes	CE (µm)	V (%)	DEGO (µm)	O (µm)	C (µm)
H1	28,99	66,40	9,09	30,76	40,00
H2	23,93	64,06	10,42	43,54	27,20
H3	26,04	63,21	11,48	44,09	36,59
H4	26,94	61,74	12,47	46,29	36,48
H5	26,98	69,35	11,77	43,62	39,34
H6	27,54	61,62	10,83	39,32	33,31
H7	23,69	61,86	10,06	42,47	46,84
H8	26,2	61,37	13,45	51,34	33,92
H9	26,71	62,97	11,51	43,09	38,78
H10	28,22	63,93	13,85	49,08	37,19
H11	26,52	60,73	13,97	52,68	30,70
H12	25,88	62,95	11,54	44,59	29,68
H13	27,61	62,34	15,04	54,47	35,24
H14	26,01	63,45	11,75	45,17	44,08
H15	26,64	69,68	11,64	43,69	40,06
H16	26,23	55,73	13,78	52,54	39,12
H17	23,72	62,58	10,93	46,08	42,17
H18	28,67	66,43	14,01	48,87	39,36
H19	26,32	76,86	12,43	47,23	37,88
H20	24,76	67,31	10,72	43,30	34,80
Média	26,38	64,2285	12,037	45,611	37,137
Amplitude	23,69- 28,99	55,73-69,53	9,09-15,04	30,76-52,54	27,20-46,84

CE = Comprimento do estilete, **V (%)** = Distância da extremidade anterior à vulva, como porcentagem do comprimento total do corpo, **DEGO**= Distância da base do estilete a abertura da glândula esofagiana dorsal, **O** = Distância da base do estilete a abertura da glândula esofagiana dorsal expressa como porcentagem em relação ao comprimento do estilete **C** = Comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda.