

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**JULIANA PIASSA**

**RIZOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA REPRODUÇÃO DE *Pratylenchus brachyurus*  
E NA INDUÇÃO DE CRESCIMENTO DO ALGODOEIRO**

**UBERLÂNDIA  
JUNHO – 2010**

**JULIANA PIASSA**

**RIZOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA REPRODUÇÃO DE *Pratylenchus brachyurus*  
E NA INDUÇÃO DE CRESCIMENTO DO ALGODOEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Agronomia, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Engenheiro  
Agrônomo.

Orientadora: Maria Amélia dos Santos

**Uberlândia – MG  
Junho – 2010**

**JULIANA PIASSA**

**RIZOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA REPRODUÇÃO DE *Pratylenchus brachyurus*  
E NA INDUÇÃO DE CRESCIMENTO DO ALGODOEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Agronomia, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Engenheiro  
Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 02 de junho de 2010.

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira  
Membro da Banca

Prof<sup>a</sup>. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi  
Membro da Banca

---

Prof. Dra. Maria Amelia dos Santos  
Orientadora

## RESUMO

O fitonematóide *Pratylenchus brachyurus* é muito disseminado em áreas produtivas de algodão. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a redução da população desse nematóide pela ação de isolados de bactérias endofíticas e verificar a indução de crescimento de plantas de algodão. Os ensaios foram conduzidos na casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia e para verificar o efeito na reprodução do nematóide, utilizou-se sete isolados de bactérias (R1, R8, LP1, L12.2, R14b, LP8 e L16.1) no primeiro ensaio, com 6 repetições contendo apenas uma planta por vaso. Cada planta foi inoculada com 5 juvenis/adultos de *P. brachyurus* e 5 mL do meio contendo as bactérias calibradas com  $DO_{600} = 0,5$ . Após 60 dias da inoculação do nematóide e das bactérias, raiz e solo foram processados pelas técnicas do liquidificador doméstico e da flutuação centrífuga em solução de sacarose, respectivamente. Foram determinados o fator de reprodução (FR) do nematóide, pela razão entre população final e população inicial. As bactérias LP8, L16.2 e R8 proporcionaram redução na reprodução do fitonematóide e os isolados LP8 e L16.2 apresentaram-se com menor número de *P. brachyurus* comparados aos demais. Para o segundo ensaio, utilizou-se 10 isolados de bactérias (706, 707, 708, 709, 710, L12.2, L16.2, R1, LP1 e LP8), uma testemunha controle (sem bactéria e com nutriente) e uma testemunha absoluta (sem bactéria e sem nutriente) com quatro repetições para verificação de indução de crescimento de plantas de algodão. As sementes foram inoculadas com as bactérias e semeadas em vasos com 1 quilo de solo composto por 100 mg de P e 100 mg de K. Cada vaso foi conduzido com 4 plantas. Quarenta e cinco dias após a semeadura, determinou-se a massa fresca e seca das raízes e da parte aérea. Foram medidos altura da parte aérea e comprimento das raízes. Todos os isolados testados diferiram apenas com relação à massa fresca das raízes, sendo que os isolados LP8, 706, 707 e 710 apresentaram um melhor desenvolvimento de plantas de algodão.

**Palavras-chave:** bactérias endofíticas, *Pratylenchus brachyurus*, algodão.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	6
2.1 Espécie vegetal estudada .....	6
2.2 Fitonematóides de importância para a cultura do algodão .....	6
2.3 <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	8
2.4 Controle de fitonematóides.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Primeiro ensaio: uso de bactérias diazotróficas endofíticas e o efeito na reprodução do fitonematóide em plantas de algodão .....	11
3.1.1 Obtenção do inóculo do nematóide e das bactérias.....	11
3.1.2 Condução do ensaio.....	12
3.1.3 Avaliação do Ensaio .....	12
3.2 Segundo ensaio: efeito de bactérias diazotróficas endofíticas na indução de crescimento em plantas de algodão.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
4.1 Primeiro ensaio .....	15
4.2 Segundo ensaio .....	16
5 CONCLUSÕES .....	19
REFERÊNCIAS .....	20

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os nutrientes absorvidos pela planta, com a exceção da água, o nitrogênio é geralmente considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (FRANCO; DÖBEREINER, 1994). O nitrogênio é o nutriente muito abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos, entre outras. Porém, apesar de ser requerido em grandes quantidades pelos seres vivos, este nutriente se encontra em uma forma quimicamente estável na natureza, e assim há necessidade de sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação. Esta transformação pode ocorrer através das bactérias fixadoras de nitrogênio.

Tais bactérias se caracterizam em três grupos: diazotróficas de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; diazotróficas associadas, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose; e as diazotróficas simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre a macro e microsimbiose, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos (EVANS; BURRIS, 1992).

Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), alguns desses microrganismos também produzem substâncias promotoras de crescimento de plantas (PCPs). Com isto, reduzem-se custos com adubação nitrogenada e minimizam-se os danos ao ambiente. Assim, todas as possibilidades de incremento da fixação biológica de nitrogênio na agricultura devem ser exploradas, não somente como alternativa econômica, mas, também ecológica. As bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio têm sido associadas a cereais, cana-de-açúcar, palmeiras, gramíneas forrageiras, frutíferas e outras plantas de importância agrônômica (BALDANI et al., 1997).

O algodoeiro é considerado uma cultura de alto risco, pois possui muitos problemas sanitários que prejudicam a produtividade, aumentando com isso o custo de produção. A maioria das doenças do algodoeiro estão relacionadas a pragas e patógenos de solo. O fitonematóide *Pratylenchus brachyurus* é bem freqüente nas regiões produtoras de algodão (INOMOTO; MACHADO, 2003; MACHADO et al., 2003; MACHADO et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de bactérias endofíticas isoladas do solo e de raízes de algodoeiro na redução da reprodução do fitonematóide *Pratylenchus brachyurus* e também na indução de crescimento vegetal do algodoeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espécie vegetal estudada

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro. O Brasil é o 5º maior produtor mundial, ficando atrás somente da China, Índia, EUA e Paquistão, e tendo como principais estados produtores o Mato Grosso, Goiás, Bahia, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Esta cultura possui a fibra, como principal produto, e também produz diversos subprodutos de grande relevância na economia, destacando-se o línter, que corresponde a cerca de 10% da semente do algodão, o óleo bruto (média de 15,5% da semente), a torta, que é quase a metade da semente, além da casca e do resíduo (4,9% do total). Seu cultivo é também de grande importância social, pois gera um grande número de empregos diretos e indiretos.

Pela característica de alta resistência a seca, o algodão encontra-se presente em vários países, sendo assim uma excelente opção para regiões semi-áridas. Além disso, o algodoeiro é uma planta que possui alto aproveitamento, pode-se utilizar como alimento de animais a partir de seu caule, folhas, maçãs e capulhos. Já o óleo refinado é utilizado na alimentação humana, na fabricação de margarina e também na produção de sabões (BELTRÃO, 1999).

### 2.2 Fitonematóides de importância para a cultura do algodão

Avaliação da presença de fitonematóides parasitos do algodoeiro foram feitas em solos de diferentes áreas produtoras. Os resultados mostraram a existência de três espécies principais de nematóides prejudiciais ao algodoeiro, sendo eles o nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*), o nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*), e o nematóide das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) (GOULART et al., 1997; INOMOTO, 2001; LORDELLO, 1984).

Os nematóides *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus* causam em média, uma redução de 20% a 30% na produtividade, em variedades suscetíveis de algodão. Para *M. incognita* as perdas podem ser maiores, ao redor de 40%. Já em casos de variedades muito suscetíveis e níveis populacionais muito altos, as perdas provocadas por nematóides podem chegar até mais que 50% de redução da produtividade.

O nematóide reniforme está amplamente disseminado nas regiões tropicais e subtropicais. É uma espécie polífaga que no Brasil ocorre em cultivos de abacaxi, banana,

café, feijão, mamão, maracujá, soja, tomate e, especialmente, algodão (MACHADO, 2006). Pode ser encontrado em diferentes tipos de solo, porém é favorecido por solos de textura fina, siltosos ou argilosos. A dispersão desse nematóide pode ocorrer por qualquer prática que movimentar o solo, como o uso de arados, grades e até mesmo colheitadeiras podem transportando o nematóide em suas rodas e pneus. Geralmente, plantas atacadas por este nematóide são mais baixas que as normais e não é muito comum a ocorrência de clorose foliar (ASMUS, 2005).

Segundo Machado (2006), o nematóide *Meloidogyne incognita*, é muito importante para a cultura do algodão, pois ocorre praticamente em todas as regiões produtoras e causa perdas elevadas. Além do algodoeiro, esta espécie de fitonematóide parasita mais de 2.000 espécies vegetais, como acerola, batata, beterraba, café, cana-de-açúcar, cenoura, cravo, feijão, figo, fumo, mamão, melão, milho, pepino, pêssigo, quiabo, soja, tomateiro, videira, dentre outros. O nematóide das galhas causa redução de tamanho e eficiência do sistema radicular e produz galhas características, principalmente nas raízes secundárias. Com isso, as plantas parasitadas podem ter como sintomas reflexos, menor desenvolvimento da área foliárea, deficiências nutricionais e murchamento temporário e excessivo durante o período mais quente do dia. Porém, um sintoma foliar típico, é o “carijó” do algodoeiro (MACHADO, 2006).

Embora o *Pratylenchus brachyurus* seja um parasito de grande importância no algodoeiro, ele é pouco estudado. Principalmente porque somente causa danos à cultura quando o nematóide das lesões está em elevadas densidades populacionais. Na maioria dos trabalhos, foi demonstrado que o algodoeiro é hospedeiro favorável de *P. brachyurus* (ENDO, 1959; CHARCHAR; HUANG, 1981).

Segundo Asmus (2005), *Pratylenchus brachyurus* é muito frequente nas plantas cultivadas no Brasil e sua presença dificulta o manejo dos nematóides de galhas e reniforme por meio de rotação de culturas. Ocorre, principalmente, em regiões tropicais e apresenta discreta preferência por solos médio-arenosos (15% a 25% de argila).

Segundo Inomoto et al. (2007) um sintoma típico causado por este fitonematóide na cultura do algodoeiro é o escurecimento de longos trechos de raízes, formando lesões radiculares. Quando inúmeras raízes apresentam este escurecimento é detectada redução no desenvolvimento da parte aérea das plantas (MACHADO, 2006).

### 2.3 *Pratylenchus brachyurus*

No gênero *Pratylenchus* não ocorre dimorfismo sexual, os machos e as fêmeas são vermiformes e sem nenhuma diferença morfológica. São endoparasitos migradores, sendo que as fêmeas depositam os ovos tanto no solo como no interior das raízes das plantas. Dos ovos eclodem os juvenis (J2), que estarão prontos para iniciar o parasitismo. Os juvenis (J2, J3 e J4) e fêmeas penetram nas raízes para se alimentarem das células e migrarem pelos tecidos das plantas.

São conhecidos como nematóides das lesões radiculares, pois invadem o parênquima cortical das raízes, produzindo extensas áreas necróticas e como consequência plantas subdesenvolvidas com baixa produtividade que levam à perdas econômicas.

As lesões causadas nas raízes das plantas hospedeiras, a princípio, são pequenas, porém aumentam gradualmente e favorecem o acesso de microrganismos que causam à destruição geral do sistema radicular (LORDELLO, 1984). Há alguns relatos que demonstram a suscetibilidade do algodoeiro a *P. brachyurus* (ENDO, 1959; GOULART et al., 1997), especialmente quando as populações iniciais são altas (INOMOTO, 2001; STARR; MATHIESON, 1985).

Segundo Machado (2006), as perdas por *P. brachyurus* são difíceis de serem detectadas, porém consegue-se estimar cerca de 10% quando este fitonematóide está em associação com *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis*. A alta frequência de *P. brachyurus* em regiões produtoras de algodão tem sido motivo de alerta para os produtores, pois diferente do *Meloidogyne*, os sintomas das plantas atacadas por *Pratylenchus* não são característicos, como as galhas são, no gênero *Meloidogyne*.

Na cultura do feijoeiro, *P. brachyurus* tem sido encontrado na rizosfera de plantas de feijão em diversas regiões de Minas Gerais, geralmente causando danos não consideráveis. Segundo Sharma et al. (2001), nas regiões de plantio irrigado do Estado, especialmente na região de Paracatu, este nematóide é facilmente encontrado causando danos às plantas, estando normalmente associado ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp) e ao nematóide espiralado (*Helicotylenchus dihystera*).

O milho sofre ataque de nematóides em todas as regiões do mundo onde é cultivado. A maioria das lavouras de milho encontram-se infestadas por nematóides fitoparasitos. De todas as espécies de nematóides que atacam a cultura do milho, aquelas pertencentes ao gênero *Pratylenchus* são as mais frequentes nas lavouras (LORDELLO, 1984).

Nos últimos anos, o nematóide das lesões radiculares tem causado grandes danos e perdas econômicas em diversas regiões do país, especialmente no Cerrado (região Centro-oeste), sendo que uma das principais culturas atacadas é a soja. O *Pratylenchus* na soja é um fitonematóide muito agressivo e é caracterizado pela descoloração de radículas, sendo que os sintomas ocorrem em função dos níveis da população (FERRAZ, 1999).

## 2.4 Controle de fitonematóides

O grande problema dos nematóides na agricultura é resultado do desequilíbrio ocasionado por práticas agrícolas inadequadas, como a monocultura. O aumento da população de nematóides em uma área ocorre devido a disponibilidade de alimento, ou seja, plantas suscetíveis.

Por isso, o controle de fitonematóides tem sido constante motivo de estudos por pesquisadores, como uso de plantas antagônicas (FERRAZ; VALLE, 1997), do controle biológico (SIKORA, 1992) e de métodos culturais (WHITEHEAD, 1997).

O método biológico para controle de nematóides pode ocorrer pela interrupção do seu ciclo de vida ou, pelo menos, pela redução da capacidade reprodutiva do nematóide (MACIEL; FERRAZ, 1996). Além disso, a transformação dos exsudados radiculares em subprodutos pela ação dos microrganismos pode fazer com que o nematóide não reconheça o estímulo quimiotrópico e continue movimentando-se no solo até morrer (FREITAS, 2001). Esse mesmo autor também cita que as rizobactérias ou seus metabólitos desencadeiam reações de hipersensibilidade nas células vegetais, impedindo que as fêmeas dos nematóides estabeleçam o seu sítio de alimentação e assim não consigam energia suficiente para produzir os ovos. Além disso, também já foi relatado que antagonistas no solo podem degradar a massa gelatinosa que envolve os ovos, reduzindo sua proteção, principalmente pelo aumento da desidratação (ORION; KRITZMAN, 1991).

As bactérias diazotróficas endofíticas, tem sido isoladas de várias gramíneas importantes na agricultura como cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo e milho, em que observou-se fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN tem sido atribuída a bactérias endofíticas diazotróficas como *Herbaspirillum* spp, *Azospirillum* spp, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* e *Azoarcus* spp (JAMES, 2000; JAMES; OLIVARES, 1997). Segundo Barraquio e Ladha (1997), estas bactérias contribuem para a nutrição da planta, seja através

do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico ou pela produção de fitohormônios que atuam no aumento do sistema radicular das plantas.

Estudos têm mostrado que existem bactérias que agem como parasitas e são utilizadas no controle biológico de nematóides, e de bactérias não parasitas, cujo efeito seria a regulação da produção de metabólitos que reduzem a eclosão de juvenis e a atração desses pelas raízes ou pela degradação de exsudados radiculares específicos que controlam o comportamento dos nematóides (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999). Isolado de *Pseudomonas* sp., promoveu o crescimento de planta de tomateiro e diminuiu a multiplicação do nematóide *Meloidogyne incognita*, em um sistema com inoculação da bactéria em presença de adubo orgânico e de DAP (Fosfato diamônico), recomendado como manejo cultural para diminuir a incidência da doença (SIDDIQUI et al., 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois ensaios com bactérias endofíticas, sendo que o primeiro consistiu da verificação do efeito de sete isolados na redução da reprodução do fitonematóide *Pratylenchus brachyurus*. O segundo, testou 10 isolados de bactérias na indução de crescimento de plantas de algodão. A condução dos ensaios ocorreu na casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia no período de março de 2009 a fevereiro de 2010.

#### 3.1 Primeiro ensaio: efeito de bactérias endofíticas na reprodução do fitonematóide em plantas de algodão

##### 3.1.1 Obtenção do inóculo do nematóide e das bactérias

O inóculo de *Pratylenchus brachyurus* foi obtido a partir de plantas de soja infectadas que foram processadas pela técnica de Boneti e Ferraz (1981), onde as raízes foram fragmentadas em pedaços de 1 a 2 cm de comprimento e colocadas no copo do liquidificador doméstico. Adicionou-se uma solução de hipoclorito de sódio (1 parte de água sanitária para 4 partes de água) ao copo do liquidificador até encobrir os fragmentos de raízes. A trituração foi feita na menor velocidade do liquidificador durante 20 s e a suspensão foi vertida na peneira de 100 mesh sobreposta a de 500 mesh. Recolheu-se o resíduo da peneira de 500 mesh com o auxílio de jatos de água de uma pisseta para o copo de Becker. A suspensão obtida foi calibrada para conter 5 juvenis e/ou adultos de *Pratylenchus brachyurus* por mL.

Já os inóculos das bactérias endofíticas foram obtidos a partir da raspagem da cultura bacteriana cultivada em placas de petri e adicionada ao tubo contendo o meio LGI-P líquido. Logo após, os tubos de ensaio foram incubados durante 48 h em uma estufa incubadora a 25° C. Após esse tempo, o meio foi calibrado para DO<sub>600</sub> igual 0,5. Foram utilizados sete isolados de bactérias obtidos de trabalhos anteriores: R1, R8, LP1, L12.2, R14b, LP8 e L16.1.

### 3.1.2 Condução do ensaio

Em maio de 2009, cinco sementes de algodão da cultivar Delta Opal foram colocados em vasos de 1,5 L contendo solo e areia na proporção de 1:2 (v:v) e mantidos em casa de vegetação, com rega diária. Após 10 dias da semeadura, foi feito o desbaste deixando apenas uma planta por vaso.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos (sete isolados de bactérias endofíticas e uma testemunha somente com nematóide sem a presença de bactéria) e seis repetições. Após 15 dias da semeadura, inoculou-se diretamente no solo 10 mL da suspensão calibrada com 5 juvenis e/ou adultos de *Pratylenchus brachyurus* por mL e imediatamente após, 5 mL do meio LGI-P contendo cada isolado de bactéria.

Realizou-se a inoculação do fitonematóide em cada vaso contendo apenas uma plântula. Foram feitos três orifícios no solo distanciados de 2 cm da haste da plântula de algodão e com 2 cm de profundidade. A suspensão de nematóides foi distribuída nestes três orifícios, constituindo a população inicial de nematóides em cada vaso.

Já as bactérias foram inoculadas diretamente no solo próximo das plantas de algodão, sem orifícios.

Uma semana após a inoculação, iniciou-se a aplicação semanal de solução nutritiva até o final do ensaio. A solução nutritiva foi composta de: 1 mL de EDTA férrico; 1 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5 mL de  $\text{KNO}_3$ ; 5 mL de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1 mL de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mL de micronutrientes (Bo, Zn, Cu, Mn, Mo) para cada 1L de água.

As temperaturas de máxima e mínima do ar foram registradas diariamente, assim como a temperatura da manhã e da tarde no solo do vaso.

### 3.1.3 Avaliação do Ensaio

Após 60 dias, a parte aérea das plantas de algodão foram cortadas rente ao solo. O solo do vaso foi colocado em uma bandeja e separou-se o solo das raízes. O solo foi homogeneizado e retirou-se uma alíquota de  $150 \text{ cm}^3$  de solo que foi processada pela técnica da flutuação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964).

Esta técnica consistiu em adicionar em um balde, 2 L de água e a alíquota de  $150 \text{ cm}^3$  de solo. Desmanchou-se os torrões para liberar possíveis nematóides. Agitou-se esta mistura e deixou em repouso durante 15 segundos. Verteu-se a suspensão em uma peneira de 20

mesh sobreposta na peneira de 400 mesh. O resíduo que ficou na peneira de 400 mesh foi recolhido com o auxílio de uma pisseta para um copo. A suspensão foi colocada em tubos de centrífuga e centrifugou-se durante 5 min a 650 gravidades. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se a solução de sacarose (454 g de açúcar para cada 1L de água) ao resíduo que permaneceu no tubo. Misturou-se bem e centrifugou-se novamente durante 1 min na mesma velocidade anterior. O sobrenadante resultante foi vertido em uma peneira de 500 mesh e lavado com água da torneira para a retirada do excesso de sacarose. O resíduo da peneira de 500 mesh foi recolhido para o copo com auxílio de jato de água de uma pisseta. Esta suspensão foi avaliada na câmara de contagem de Peters, determinando-se a população do fitonematóide.

Já as raízes, foram processadas pela técnica de Boneti e Ferraz (1981) que consistiu-se em pesar as raízes e em seguida cortá-las em fragmentos de 1 a 2 cm de comprimento. Colocados em um copo de liquidificador contendo solução de hipoclorito de sódio (1 parte de água sanitária : 4 partes de água), procedeu-se a trituração durante 20 s. A suspensão obtida foi vertida em um conjunto de peneiras sobrepostas de 100 e 500 mesh, respectivamente. O resíduo da peneira de 500 mesh foi recolhido, com o auxílio de uma pisseta com água para um copo. Esta suspensão foi avaliada quanto à população de *P. brachyurus* com auxílio da câmara de contagem de Peters.

O fator de reprodução (FR) do nematóide foi calculado pela razão entre a população final (solo + raiz) e a população inicial. Observou-se também se houve ou não diferença entre os isolados quanto ao número de nematóides.

### **3.2 Segundo ensaio: efeito de bactérias endofíticas na indução de crescimento em plantas de algodão**

Em novembro de 2009, 10 isolados de bactérias endofíticas foram cultivados em meio 523 líquido por 48 h. Os isolados foram: 706, 707, 708, 709, 710, L12.2, L16.2, R1, LP1 e LP8. Após 48 h, retirou-se 250 µL de cada isolado e adicionou em 2 mL de solução de sacarose à 10% que se encontrava em um copo de Becker. Posteriormente, 20 g de sementes de algodão foram adicionadas em cada isolado, deixando-as na solução durante 30 min.

Paralelamente, preparou-se o solo, sendo este coletado em área de cultivo de milho e adubado com 100 mg de P ( $K_2PO_4$ ) e 100 mg de K ( $Na_2HPO_{4.7}H_2O$ ) para cada 1 kg de solo. Este procedimento foi conduzido para as sementes tratadas com os 10 isolados e para o

tratamento que não houve aplicação de bactéria (controle). Vinte dias após a emergência, 100 mg de N (uréia) foram aplicados no solo do tratamento testemunha. Além desses 11 tratamentos, foi realizado um tratamento em branco (absoluto), em que não ocorreu nem inoculação de bactéria e nem adição de nutrientes.

Após o preparo do solo e dos isolados das bactérias, semeou-se seis sementes de algodão em vasos de 1,5 L, contendo 1 kg de solo e mantidos em casa de vegetação com rega diária. Após 15 dias de emergência, foi feito um desbaste deixando quatro plantas por vaso. Cada vaso foi considerado a unidade experimental.

As temperaturas máxima e mínima do ar foram registradas diariamente como também a temperatura do solo do vaso na manhã e na tarde de cada dia.

Após 45 dias da semeadura, a parte aérea foi cortada rente a superfície do solo e mediu-se, com auxílio de uma fita métrica, a altura das plantas. A massa fresca da parte aérea de cada planta foi pesada em balança analítica. As raízes foram separadas do solo e mediu-se o tamanho e o peso das mesmas.

A parte aérea e as raízes foram acondicionadas em sacos de papel contendo furos. Os sacos foram colocados na estufa à 60°C durante 72 h ou até peso constante. Após esse período, a parte aérea e as raízes foram novamente pesadas para obtenção da massa seca.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2000) e a testes que mostram o grau de semelhança entre as ações das bactérias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Primeiro ensaio

O fator de reprodução do fitonematóide *P. brachyurus* está apresentado na Tabela 1. Observa-se que os isolados LP8, L16.2 e R8, apresentaram FR menor do que 1, ou seja, afetaram a reprodução do fitonematóide *Pratylenchus brachyurus*. Já as bactérias R1, L12.2, LP1, R14b e a testemunha apresentaram FR maior do que 1.

Pela Figura 1, nota-se que os isolados LP8 e L16.2, apresentaram os menores números de nematóides comparada aos demais.

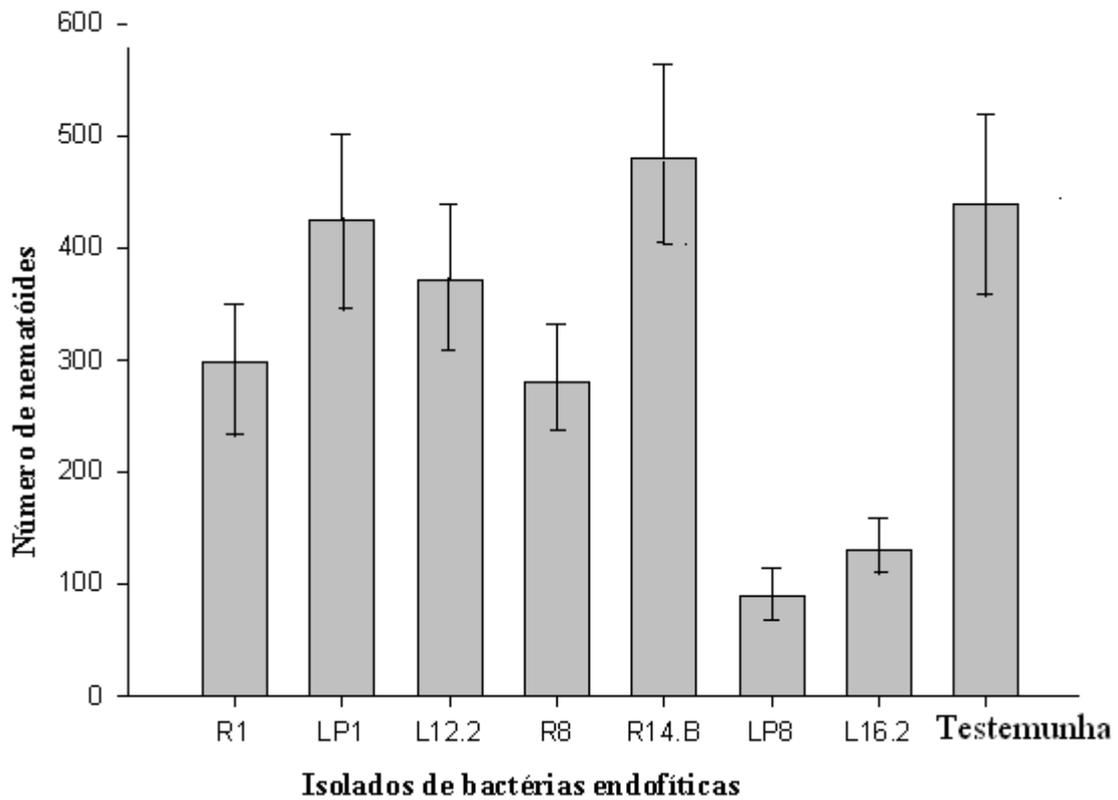
Normalmente, há um percentual baixo de rizobactérias isoladas com efeito contra fitopatógenos. Oostendorp e Sikora (1989) isolaram 290 culturas bacterianas da rizosfera de beterraba açucareira e microbiolizaram as sementes visando ao controle de *Heterodera schachtii*. Apenas oito isolados foram eficientes contra o nematóide, sendo três desses isolados da espécie *Pseudomonas fluorescens*.

Segundo Sikora (1992) e Weller (1988), o número de bactérias isoladas da rizosfera com potencial para o controle de fitonematóides é em torno de 9 a 10% da população total.

Muitos pesquisadores afirmam que as rizobactérias atuam como indutoras de resistência sistêmica (WEI et al., 1991; TUZUN et al., 1992; TUZUN; KLOEPPER, 1995). Porém, na maioria das vezes não são determinados os reais mecanismos de controle envolvidos. Segundo Steiner e Schonbeck (1995) um dos critérios de indução de resistência sistêmica é a inespecificidade de proteção contra fitopatógenos.

**Tabela 1** – Fator de reprodução de *Pratylenchus brachyurus* em algodão sob ação de isolados de bactérias endofíticas. Uberlândia, UFU, maio de 2009.

Isolados de bactérias endofíticas	FR
LP8	0,52
L16.2	0,43
R8	0,93
R1	1,09
L12.2	1,24
LP1	1,51
R 14b	1,6
Testemunha (sem isolado)	1,79
FR ≥ 1,0 bom hospedeiro ou suscetível	FR < 1,0 mau hospedeiro ou resistente



**Figura 1** – Efeito de bactérias endofíticas na reprodução do fitonematóide *P. brachyurus* em plantas de algodoeiro. Uberlândia, UFU, maio de 2009.

#### 4.2 Segundo ensaio

A indução de crescimento das plantas de algodão pelas bactérias endofíticas pode ser observada nas Tabelas 2 e 3. De acordo com a Tabela 2, observa-se que não houve diferença em altura de parte aérea, massas fresca e seca de parte aérea.

Segundo Stein (1988), *Pseudomonas fluorescens*, utilizada em tratamento de sementes, promoveu aumento na taxa de germinação e no peso de massa fresca de até 60,3 e 78%, respectivamente, em plântulas de tomateiro.

Mantovanello e Mello (1994) utilizando rizobactérias do gênero *Pseudomonas*, também obtiveram aumentos no peso da parte aérea de até 44 % e raízes de 36,8 % para plântulas de tomateiro, em solo não autoclavado. Já em solo autoclavado, observou aumento de 138,5 a 119%.

**Tabela 2** – Altura da parte aérea das plantas, peso da parte aérea fresca e seca de plantas de algodão tratadas com bactérias endofíticas. Uberlândia, UFU, 2009.

Bactérias endofíticas	Altura de parte aérea (cm)	Massa fresca de parte aérea (g)	Massa seca de parte aérea (g)
709	31,03a	16,97a	8,67 a
706	30,38a	17,55a	8,62 a
Testemunha absoluta	30,44a	17,33a	8,50 a
LP1	30,85a	15,80a	8,11 a
R1	30,88a	16,68a	8,42 a
L12.2	30,97a	17,82a	8,52 a
708	31,31 a	17,31a	8,45 a
LP8	31,31 a	16,89a	8,67 a
707	31,35a	16,60a	8,57 a
710	31,66a	18,71a	9,12 a
L16.2	31,88a	17,13a	8,56 a
Testemunha controle	32,53a	17,94a	8,92 a
C.V. (%)	6,76%	9,04%	5,33%

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

**Tabela 3** – Comprimento das raízes, peso de massa fresca e seca de raízes de plantas tratadas com bactérias endofíticas. Uberlândia, UFU, 2009.

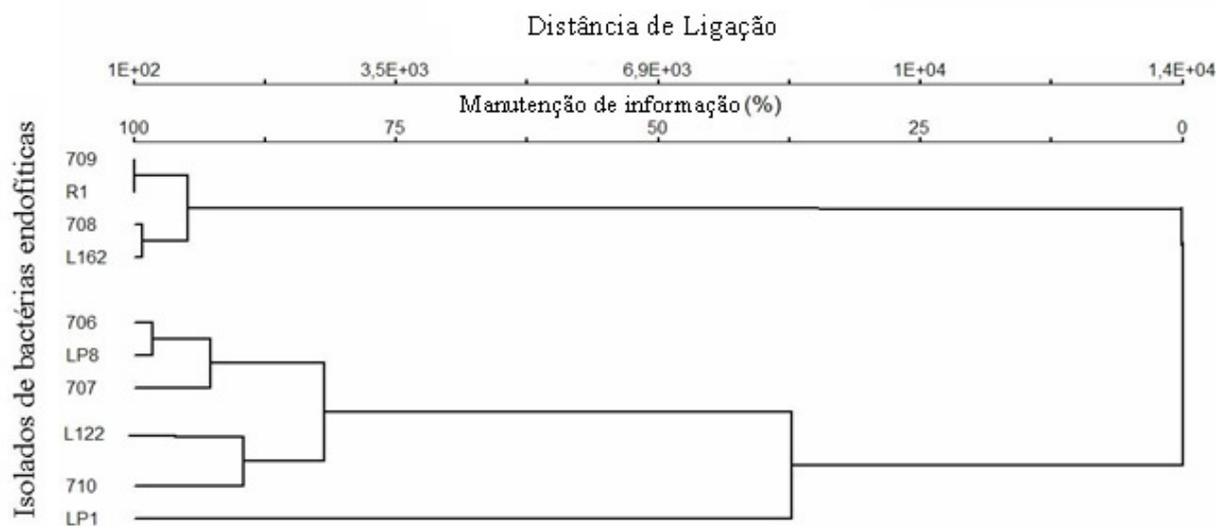
Bactérias diazotróficas endofíticas	Tamanho das raízes (cm)		Massa Fresca das raízes (g)	Massa Seca das raízes (g)
Testemunha absoluta	28,69	a*	8,31 b*	6,03 a*
708	31,81	a	10,13 ab	6,18 a
L16.2	32,16	a	10,83 ab	6,33 a
709	33,19	a	10,23 ab	6,18 a
R1	33,25	a	10,88 ab	6,26 a
LP8	33,69	a	11,74 a	6,45 a
706	33,85	a	11,88 a	6,44 a
707	34,28	a	12,92 a	6,53 a
Testemunha controle	34,56	a	11,12 ab	6,46 a
L12.2	34,72	a	10,81 ab	6,21 a
710	35,38	a	11,49 a	6,50 a
LP1	38,22	a	10,32 ab	5,98 a
C.V. (%)	14,65%		10,53%	4,36%

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

Pela Tabela 3, os isolados de bactérias endofíticas não proporcionaram diferença no comprimento das raízes e nem no peso da massa seca das mesmas.

Já na matéria fresca de raízes, pode-se observar que o tratamento sem bactéria e sem nutrientes com 8,31 g de raízes frescas diferiu dos isolados LP8, 706, 707 e 710, que apresentaram 11,74; 11,88; 12,92 e 11,49g de raízes frescas, respectivamente.

As características de todos os isolados constituíram o conjunto de dados modelados em um cladograma, ou seja, um diagrama dos isolados em forma de árvore (Figura 2). Os isolados de bactérias estão separados em dois grupos ou clados, sendo que os isolados das bactérias 709, R1, 708 e L16.2 possuem aproximadamente 90% de similaridade e os isolados das bactérias 706, LP8, 707, L12.2 e 710, apresentam aproximadamente 80% de características semelhantes. Já o isolado LP1, apresenta apenas 37,5% do segundo clado.



**Figura 2** – Cladograma de similaridade obtido a partir da análise de todas as características dos isolados de bactérias endofíticas no algodoeiro. Uberlândia, UFU, 2009.

## 5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

- os isolados de bactérias LP8, L16.2 e R8, afetaram a reprodução do fitonematóide *P. brachyurus* em plantas de algodão.
- os isolados LP8, 706, 707 e 710 apresentaram melhor desenvolvimento de plantas de algodão na característica peso de raízes frescas.

## REFERÊNCIAS

- ASMUS, G. L. Reação de cultivares de algodoeiro a *Rotylenchulus reniformis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: USP/ Esalq: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2005, p. 101.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.69, n.1, p.116, 1997.
- BARRAQUIO, W.L; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, The Hague, v.194, p.15-24, 1997.
- BELTRÃO, N. E. de M. (Org.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa – CTT/EMBRAPA-CNPA. 1999. v. 2, 551p.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey e Baker para a extração de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.6, p.553, 1981.
- CHARCHAR, J.M.; HUANG, C.S. Circulo de hospedeiros de *Pratylenchus brachyurus*. III Plantas diversas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.6, p.469-473, 1981.
- ENDO, B.Y. Responses of the root lesion nematodes, *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaeae* to various plants and soil types. **Phytopatology**, Saint Paul, v.49, p. 417-421, 1959.
- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J (ed). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.
- FERRAZ, L.C.C.B. Gênero *Pratylenchus* – os nematóides das lesões radiculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.7, p.157-195, 1999.
- FERRAZ, S.; VALLE, L.A.C. Controle de fitonematóides por plantas antagônicas. **Caderno didático nº 7**. Viçosa: Editora UFV, 1997, 72 p.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. **Anais...**, UFSCar, São Carlos, SP, Julho, 2000. p.255-258.
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.20, n.1, p.68-74, 1994.
- FREITAS, L. G., 2001. **Rizobactérias versus nematóides**. Disponível em:< <http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>> Acesso em: 14 de janeiro de 2009.
- GOULART, A.M.C.; INOMOTO, M. M; MONTEIRO, A.R. Hospedabilidade de oito cultivares de algodão a *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, DF, v.21, p.111-118, 1997.

INOMOTO, M. M. Algodão: atacado por nematóides. **Cultivar**, Pelotas, v.3, n. 30, p. 5-7, 2001.

INOMOTO, M. M.; MACHADO, A. C. Z. Efeito de *Meloidogyne incognita* raça 4 e *Pratylenchus brachyurus* no crescimento de algodoeiro cv. Delta Opal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. Algodão: um mercado em evolução: **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão; Goiânia: Fundação GO, 2003. 1 CD ROM.

INOMOTO, M. M.; ASMUS, G. L.; SILVA, R. A.; MACHADO, A. C. Z. **Nematóides**: uma ameaça à cotonicultura brasileira. [S.l.]: Syngenta . maio. 2007. p. 11-13. 1 Folheto

JAMES, E.K. Nitrogen Fixation in endofitic and associative symbiosis. **Fields Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 197 – 209, 2000.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection e colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.17, n.1, p.77-119, 1997.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal –flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, DC., v. 48, p.652, 1964.

LORDELLO, L.G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8.ed. São Paulo: Nobel, 1984.

MACIEL, S.L.; FERRAZ, L.C.C.B. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.53, p.956-960, 1996.

MACHADO, A. C. Z. ***Pratylenchus brachyurus* x algodoeiro**: patogenicidade, métodos de controle e caracterização molecular de populações. 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MACHADO, A. C. Z.; BELUTI, D. B.; INOMOTO, M. M. Efeito de densidades populacionais iniciais de *Pratylenchus brachyurus* no crescimento do algodoeiro cv. Delta Opal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão; Goiânia: Fundação GO, 2003. 1 CD ROM.

MACHADO, A. C. Z.; SIQUEIRA, K. M. S. de; GALBIERI, R.; CIA, E. Levantamento preliminar das espécies de fitonematóides associadas à cultura do algodão no estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. **Algodão, uma fibra natural**: anais. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, D.F.: Abrapa, 2005. 1CD-ROM.

MANTOVANELLO, C.M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 20, p. 123-126, 1994.

ORION, D.; KRITZMAN, G. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. **Revue de Nématologie**, Bondy, v.14, p.481-483, 1991.

OOSTENDORP, M.; SIKORA R.A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. **Revue de Nematologie**, Bondy, v.12, n.1, p 77-83, 1989.

SHARMA R. D.; CAVALCANTE M. J. B.; MOURA G. M.; VALENTIM J. F. **Fitonematóides associados às cultivares de soja no estado do Acre**. Biblioteca eletrônica da EMBRAPA Cerrados, Brasília, out. 2001. Disponível em: <<http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2001/comtec/comtec56.pdf>> Acesso em 13 ago. 2007.

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

SIDDIQUI, Z. A.; IQBAL, A.; MAHMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 16, p. 179-185, 2001.

SIKORA, R.A. Management of the antagonistic in agricultural ecosystems for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto v.30, p.245-270, 1992.

STARR, J.L.; MATHIESON, T. Reproduction of *Pratylenchus brachyurus* on cotton and growth response to infection by the nematode. IN: BELTWISE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCE, 1985, New Orleans. **Proceedings**.....Memphis: National Cotton Council, 1985, p. 25.

STEIN, R.L.B. **Efeito de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no controle *in vitro* de fungos do solo e no desenvolvimento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)** 1988. 125 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

STEINER, U.; SCHONBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R.; J. KUC (ed.). **Induced resistance to disease in plants**, Developments in Plant Pathology. V. 4, Dordrech: Kluwer Academic Pub, 1995, p. 86-110.

TUZUN, S; JUAREZ, J.; NESMITH, W.C.; KUC, J. Induction of systemic resistance in tobacco against metalaxyl-tolerant strains of *Peronospora tabacina* and the natural occurrence of the phenomenon in Mexico. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, p. 425- 429, 1992.

TUZUN, S.; KLOEPPER, J. W. Potencial Applications of plant growth-promoting rhizobacteria to induced systemic disease resistance. In: REUVENI, R. (Ed). **Novel Approaches to Ingrated Pest Management**. Boca Raton: Lewis Publishers. 1995. p115-127.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 221-224, 1991.

WELLER, D.M. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 1508-15012, 1988.

WHITEHEAD; A.G. **Plant nematode control**. London: CAB International. 1997. 384p.