

Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias

Ismail Teodoro de Souza Júnior⁽¹⁾, Andréa Bittencourt Moura⁽¹⁾, Jaqueline Tavares Schafer⁽¹⁾, Bianca Obes Corrêa⁽¹⁾ e César Bauer Gomes⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitossanidade, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS. E-mail: agrojunior1@yahoo.com.br, abmoura@ufpel.tche.br, jaquelinets@gmail.com, bianca.obescorreia@yahoo.com.br ⁽²⁾Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: cbauer@cpact.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade entre rizobactérias biocontroladoras pré-selecionadas e o efeito de suas combinações sobre a queima-das-bainhas (*Rhizoctonia solani*), a meloidoginose (*Meloidogyne graminicola*) e a promoção de crescimento de plantas de arroz. A compatibilidade foi determinada pela antibiose. O efeito das combinações de isolados foi avaliado por microbiolização de sementes de arroz, cultivar El Paso L144, com suspensões das rizobactérias DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*P. fluorescens*), DFs306 (ainda não identificada), DFs416 e DFs418 (*Bacillus* sp.). Essas rizobactérias foram usadas isoladamente ou combinadas em arranjos de dois, três e quatro isolados. O isolado DFs223 não foi combinado com nenhum outro por ser incompatível com os demais isolados. Cinco combinações de rizobactérias (DFs185/418, DFs306/416, DFs306/418, DFs416/418, DFs185/306/418) e o isolado DFs306 destacaram-se por reduzir a reprodução de *M. graminicola* e promover o crescimento das plantas. A combinação DFs185/306 apresentou os melhores resultados quanto ao controle de *R. solani* e à promoção de crescimento. A combinação DFs306/416 proporcionou os melhores resultados para o controle das duas doenças.

Termos para indexação: *Meloidogyne graminicola*, *Rhizoctonia solani*, controle biológico, microbiolização de sementes, rizobactérias promotoras de crescimento.

Biocontrol of sheath blight and root-knot nematode and growth promotion of rice plants by rhizobacteria

Abstract – The objective of this work was to evaluate the compatibility between previously selected biocontroller rhizobacteria and the effect of their combination upon sheath blight (*Rhizoctonia solani*), root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) and growth promotion in rice plants. The compatibility between these bacteria was determined by the overlay antibiosis. The effect of isolate combinations was evaluated by seed microbilization of the rice cultivar El Paso L144 with rhizobacteria suspensions of DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*P. fluorescens*), DFs306 (unidentified), DFs416 and DFs418 (*Bacillus* sp.). These rhizobacteria were used alone or combined in arrangements of two, three and four isolates. The DFs223 isolate was not combined because it is incompatible with the other bacteria. Five rhizobacteria combinations (DFs185/418, DFs306/416, DFs306/418, DFs416/418, DFs185/306/418) and the isolate DFs306 stood out for reducing *M. graminicola* reproduction and promoting plant growth. Combination DFs185/306 presented the best results for the control of *R. solani* and for growth promotion. The DFs306/416 combination provided the best results for the control of the two diseases.

Index terms: *Meloidogyne graminicola*, *Rhizoctonia solani*, biological control, seed microbilization, growth-promoting rhizobacteria.

Introdução

Vários microrganismos podem associar-se patogenicamente às plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) e causar lesões na parte aérea e radicular, levando à redução da produção (Nunes et al., 2004). Entre os patógenos habitantes do solo que causam danos à cultura do arroz, destacam-se o fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] e o nematoide-das-galhas *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield.

A queima-das-bainhas no arroz, causada por *R. solani*, ocorre em áreas temperadas e tropicais. Alguns fatores têm agravado sua incidência e severidade, como a utilização excessiva de adubação nitrogenada, alta densidade de plantas e plantio de cultivares de ciclo precoce, de baixa estatura, alto perfilhamento e de maior suscetibilidade. O cultivo do arroz sucedido por hospedeiros desse fungo leva à continuidade do ciclo do patógeno e ao aumento de inóculo (Nunes et al., 2004).

A meloidoginose em arroz irrigado, causada por *M. graminicola*, não é considerada uma doença de grande impacto nas lavouras brasileiras; no entanto, sua incidência tem aumentado a cada ano. As perdas causadas não foram ainda quantificadas, no entanto, o controle dessa espécie pode resultar em aumento da produção de até 80% (Soriano & Reversat, 2003). A ação parasítica do nematoide leva à redução da absorção de nutrientes e, em casos muito graves, à morte da planta (Steffen, 2007). Este patógeno pode sobreviver no solo, em áreas úmidas, na forma de juvenil de segundo estágio (J2) e em massas de ovos, ou ainda, em ampla gama de hospedeiros (Tihohod, 1993).

Limitações do controle químico e a inexistência de cultivares resistentes à queima-das-bainhas e à meloidoginose levaram ao estudo do controle biológico dessas doenças. Bactérias saprófitas da rizosfera, denominadas rizobactérias, têm grande potencial na redução de fitopatógenos do solo. O uso delas, principalmente das espécies de *Bacillus* e de *Pseudomonas*, é citado para o controle da queima das bainhas (Nandakumar et al., 2001; Ludwig & Moura, 2007) e do nematoide-das-galhas do arroz (Padgham & Sikora, 2007; Ludwig, 2009).

Uma das estratégias para aumentar a eficiência do controle biológico de doenças, utilizada atualmente, é a combinação de microrganismos. Esse uso pode ampliar o espectro de ação sobre diferentes patógenos e estabilizar o efeito controlador sob diferentes condições de cultivo e de ambiente (Raupach & Kloepper, 1998; Boer et al., 2003).

Resultados obtidos por Ludwig & Moura (2007) e por Ludwig (2009) apontaram para o controle potencial de *R. solani* e de *M. graminicola*, quando foram utilizadas individualmente as rizobactérias DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*P. fluorescens*), DFs306 (não identificado), DFs416 e DFs418 (*Bacillus* sp.). Em geral, os níveis de controle alcançados foram significativos; porém, a eficiência propiciada pelos diferentes tratamentos variou entre os ensaios realizados (Ludwig & Moura, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade entre rizobactérias biocontroladoras pré-selecionadas e o efeito de suas combinações sobre a queima-das-bainhas, a meloidoginose e a promoção de crescimento de plantas de arroz em casa de vegetação.

Material e Métodos

Os ensaios foram realizados em 2009, na Universidade Federal de Pelotas e na Embrapa Clima Temperado, no Município de Pelotas, RS, Brasil.

As rizobactérias utilizadas foram: DFs185, *Pseudomonas synxantha* (Ehrenberg) Hollan; DFs223, *P. fluorescens* Migula; DFs416 e DFs418, *Bacillus* sp. Cohn; e DFs306 (não identificada). As rizobactérias foram pré-selecionadas por apresentar potencial in vivo para o controle de *Bipolaris oryzae*, *Gerlachia oryzae* (Ludwig et al., 2009), *Rhizoctonia solani* (Ludwig & Moura, 2007) e *Meloidogyne graminicola* (Ludwig, 2009).

Para determinar a compatibilidade entre rizobactérias, foi realizado o pareamento delas em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970), pelo método de sobrecamada (Romeiro, 2001). Todas as combinações foram realizadas de forma que cada isolado foi pareado com todos os demais em placa de Petri, com quatro repetições constituídas de uma placa com quatro isolados. A avaliação foi realizada 24 horas após a adição da sobrecamada com o isolado desafiante. Observou-se a presença ou ausência de halo de inibição de crescimento do isolado desafiante.

Foram instalados dois experimentos em casa de vegetação para avaliar a efetividade das combinações compatíveis das rizobactérias no biocontrole da queima-das-bainhas (*R. solani*) e do nematoide-das-galhas (*M. graminicola*). Testaram-se, individualmente, as rizobactérias DFs185, DFs223, DFs306, DFs416, DFs418 e as combinações DFs185/306, DFs185/416, DFs185/418, DFs306/416, DFs306/418, DFs416/418, DFs185/306/416, DFs185/306/418, DFs185/416/418, DFs306/416/418, DFs185/306/416/418. Suspensões das rizobactérias foram preparadas com solução salina (NaCl a 0,85%) de cada um dos isolados com 24 horas de crescimento, a 28°C em meio 523 sólido (Kado & Heskett, 1970). A concentração de cada suspensão foi ajustada para $A_{540} = 0,5$. As combinações foram obtidas a partir de suspensões dos isolados preparadas individualmente, e as concentrações foram ajustadas para ser posteriormente misturadas em volumes iguais.

Para a microbiolização, sementes de arroz da cultivar El Paso L144 foram imersas nas suspensões, durante 30 min sob agitação, a 10°C. As testemunhas foram constituídas de sementes tratadas apenas com solução salina (T) ou tratadas com solução salina e o fungicida

carboxin + thiran (TF), indicado para o tratamento de sementes, na dosagem final de 3 mL kg⁻¹ de sementes. Para o ensaio com biocontrole de *M. graminicola*, não foram utilizadas sementes tratadas com TF.

Para estudar o biocontrole de *R. solani*, após o período de agitação, cinco sementes foram depositadas em vasos com capacidade de 1 kg, em solo não esterilizado, com suplementação mineral realizada de acordo com as recomendações indicadas para a cultura (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999). Após a emergência das plântulas, realizou-se o desbaste, tendo-se deixado duas plantas por vaso. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação não climatizada, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento.

Um isolado virulento de *R. solani*, obtido a partir de plantas sintomáticas, foi inoculado nas plantas. O inóculo foi obtido da seguinte forma: palitos de madeira (± 2 cm de comprimento), previamente autoclavados em Erlenmeyer, e discos de micélio de 5 mm de diâmetro, obtidos a partir das bordas da colônia com crescimento ativo de *R. solani*, foram transferidos para placas de Petri com BDA. Em seguida, as placas foram incubadas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, quando o crescimento micelial de *R. solani* recobriu os palitos. Depois de 35 dias da semeadura (perfilhamento), o isolado foi inoculado nas plantas, pela inserção de um palito colonizado por *R. solani* na metade da bainha do perfilho principal, e as plantas foram transferidas para câmara úmida, onde permaneceram por 24 horas. A avaliação da queima-das-bainhas foi feita por medições, com régua milimetrada, no sentido longitudinal da extensão das lesões e das bainhas. Foram realizadas sete avaliações, iniciadas a partir do quarto dia após a inoculação, com intervalos de dois dias entre elas. As medidas de lesões e de bainhas em cada planta foram utilizadas para construir a relação lesão:extensão. A partir dos valores obtidos, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pelo programa Gwbasic (Maffia, 1986). Para o cálculo da percentagem de controle da doença, foi utilizada a AACPD, tendo-se considerado a testemunha como 0% de controle.

Após a última avaliação de biocontrole, foi contado o número de perfilhos (NP) e, em seguida, as plantas tiveram a parte aérea separada do sistema radicular, por meio de um corte realizado na altura do colo. A área foliar total (AF) foi medida com o determinador de área foliar Licor, modelo LI-3100 (LI-COR Biosciences,

Lincoln, EUA). As raízes foram lavadas com água corrente sobre peneira. A seguir, a massa de matéria seca da parte aérea (MSA) e das raízes (MSR) das plantas de cada parcela foi determinada após secagem em estufa a 60°C , por três dias.

Para estudar o biocontrole de *M. graminicola*, após a microbiolização, cinco sementes foram depositadas em vasos com capacidade de 700 mL, que continham solo autoclavado. Após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste, tendo-se deixado uma planta por vaso. O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições.

Uma população pura de *M. graminicola* (Est. VS1) (Carneiro & Almeida, 2001) foi multiplicada em plantas de arroz cultivadas em casa de vegetação, em solo autoclavado. Essa população foi utilizada como inóculo. Procedeu-se à extração dos ovos e de juvenis de segundo estágio (J2), conforme Hussey & Barker (1973). Após a emissão da quarta folha, 10 mL da suspensão com 5.000 ovos + J2 do nematoide foram inoculados, por meio de depósito ao redor das plantas, em cinco orifícios de 2 cm de profundidade. O solo foi mantido úmido até a avaliação do ensaio.

Cinquenta dias após a inoculação, as plantas foram coletadas e as raízes foram separadas da parte aérea e lavadas com água corrente, até a retirada de todo o solo. A parte aérea foi seca para a mensuração da massa de matéria seca (MSA). Em seguida, as raízes foram secas com papel toalha e pesadas para a determinação da massa de matéria fresca (MFR).

A contagem do número de galhas (NG) foi realizada em todo o sistema radicular, com uso de microscópio estereoscópico. Em seguida, as raízes foram processadas para a extração de ovos, cortadas e trituradas em liquidificador por 30 s em solução de hipoclorito de sódio a 0,1%. Esse material foi vertido em peneiras de 80 e 500 Mesh e lavado com jatos de água destilada (Hussey & Barker, 1973). A contagem do número de ovos (NO) foi feita em câmara de Peters, em observação sob microscópio óptico. Para o cálculo do fator de reprodução (FR), foi utilizada a fórmula $FR = Pf/Pi$, em que: Pf é a população final de ovos + J2, e Pi a população inicial de ovos + J2.

Para a análise estatística, os dados da AACPD, obtidos no ensaio para o controle de *R. solani*, o número de galhas e o número de ovos de *M. graminicola* foram previamente transformados em $(x + 1)^{0.5}$.

Os resultados dos ensaios do biocontrole de *R. solani* e de *M. graminicola* foram expressos em percentagem de controle, tendo-se considerado a testemunha como 0%, e submetidos à análise de variância, com suas médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Todo o procedimento foi realizado pelo programa SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

Resultados e Discussão

Observou-se que a rizobactéria DFs223 apresentou halo de inibição em desafio a todas as demais e, portanto, foi incompatível em qualquer combinação. As demais rizobactérias não foram sensíveis entre si, o que tornou possível sua utilização em 11 combinações de dois, três e de quatro isolados.

O controle da queima-das-bainhas proporcionado pelas rizobactérias variou entre 0 e 50%. Entre todos os tratamentos, apenas a combinação DFs185/306/418 não proporcionou qualquer grau de controle da doença. Dez tratamentos apresentaram diferença em relação à testemunha, e a média de controle foi de 37%, com

variação de 26 a 50%. O máximo controle foi alcançado pelas combinações DFs185/416 e DFs185/306/416 (Tabela 1).

De modo geral, o número de perfilhos (NP), a massa de matéria seca da raiz (MSR), a massa de matéria seca da parte aérea (MSA) e a área foliar total (AF) tiveram comportamento variado. Houve tratamentos que proporcionaram incrementos significativos dessas variáveis, e outros que não surtiram efeito sobre o crescimento das plantas.

Em relação ao NP, nenhum dos tratamentos proporcionou ganhos em relação à testemunha. Para MSR, dez tratamentos diferiram significativamente da testemunha (T), e proporcionaram um incremento médio de 44%, com variação entre 26 e 72%, tendo alcançado valores similares aos das plantas não infectadas com o patógeno. Para MSA, as combinações DFs185/306, DFs185/418, DFs185/306/418 e DFs185/416/418 proporcionaram incrementos em relação à testemunha (média de 44%, com variação entre 25 e 64%), com média de 70% de aumento da

Tabela 1. Severidade de queima-das-bainhas (AACPD), percentual de controle (PC), massa de matéria seca de raízes (MSR), número de perfilhos (NP), massa de matéria seca da parte aérea (MSA) e área foliar de plantas de arroz, originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados e combinações de rizobactérias, em casa de vegetação⁽¹⁾.

Tratamento	AACPD	PC ⁽²⁾ (%)	MSR (g)	Variação ⁽³⁾ (%)	NP	MSA (g)	Variação (%)	Área foliar (cm ²)	Variação (%)
DFs185/306	1,1b	43	6,40a	41	6,0	2,27a	30	188,24a	52
DFs185/416	1,0b	45	5,12b	13	5,0	1,98b	14	161,54b	31
DFs185/418	1,8a	8	4,68b	3	7,0	2,17a	25	209,02a	69
DFs306/416	1,2b	36	6,44a	42	5,0	1,79b	3	134,79b	9
DFs306/418	1,2b	36	3,02b	-34	5,0	1,82b	5	134,82b	9
DFs416/418	1,4b	31	4,34b	5	5,0	1,56b	-10	116,34b	-6
DFs185/306/416	1,0b	50	7,76a	71	5,0	1,67b	-4	130,86b	6
DFs185/306/418	2,1a	0	7,84a	72	6,0	2,86a	64	215,28a	74
DFs185/416/418	1,7a	14	7,80a	71	7,0	2,75a	58	228,74a	85
DFs306/416/418	1,7a	13	6,08a	34	5,0	1,96b	13	159,35b	29
DFs185/306/416/418	1,3b	33	5,73a	26	6,0	1,80b	3	160,90b	30
DFs185	1,4b	26	5,16b	13	5,0	1,86b	7	137,34b	11
DFs223	1,5a	21	5,84a	28	5,0	1,60b	-8	139,78b	13
DFs306	1,7a	11	4,43b	3	5,0	1,56b	-10	148,87b	20
DFs416	1,1b	43	5,84a	28	4,0	1,60b	-8	165,39b	34
DFs418	1,4b	29	5,86a	29	5,0	1,92b	10	143,03b	16
T	2,0a	0	4,55b	0	4,0	1,74b	0	123,73b	0
T - I	-	-	6,13a	35	4,0	1,80b	3	136,67b	10
TF	2,2a	0	4,28b	6	4,0	1,46b	-16	121,87b	-2
CV (%) ⁽⁴⁾	10,85		30,24		27,23	24,28		18,34	

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. ⁽²⁾Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em comparação à AACPD da testemunha. ⁽³⁾Variação percentual dos valores da variável em comparação aos apresentados pela testemunha.

⁽⁴⁾Coeficiente de variação dos valores transformados para $(x+1)^{0.5}$. T, testemunha tratada com salina; T - I, testemunha sem inoculação do patógeno; TF, tratamento com o fungicida carboxin + thiram na concentração de 3 mL kg⁻¹ de sementes.

área foliar (valores entre 52 e 85%), o que resultou em valores superiores aos que tiveram as plantas não infectadas (Tabela 1).

De modo geral, considerando-se todas as variáveis de crescimento avaliadas, as combinações DFs185/306, DFs185/306/418 e DFs185/416/418 proporcionaram ganhos significativos para três das quatro variáveis avaliadas. No entanto, entre estas, somente a combinação DFs185/306 diferiu da testemunha quanto ao controle da doença (Tabela 1).

Todos os tratamentos reduziram o número de galhas (NG) de *M. graminicola* nas raízes das plantas originadas de sementes microbiolizadas, com variação de 30 a 73% em relação à testemunha e média de 46%. Quatorze tratamentos proporcionaram redução significativa de 32 a 62% (média de 52%) no número de ovos (NO), e de 31 e 61% (média de 51%) no fator de reprodução (FR) do nematoide (Tabela 2).

A massa de matéria fresca das raízes da testemunha infectada com o nematoide foi maior do que a das plantas testemunhas, que não receberam inoculação do patógeno, e não diferiu de oito tratamentos.

A massa de matéria seca da parte aérea apresentou diferenças significativas entre essas duas categorias de plantas testemunhas. Dez tratamentos diferiram das testemunhas e proporcionaram incremento médio de 18% (entre 4 e 38%) (Tabela 2).

Houve diferenças significativas entre os tratamentos para as cinco variáveis avaliadas no ensaio, embora os níveis de discriminação tenham variado para cada uma delas. Em ordem decrescente de discriminação estão: a variável relacionada aos sintomas (NG), com quatro grupos, dos quais três resultaram em menor intensidade de sintomas; as variáveis relacionadas à produção de ovos (NO e FR), com três grupos, dos quais um similar à testemunha e dois de valores inferiores aos da testemunha; as variáveis relacionadas ao crescimento (MSA e MFR), com dois grupos, dos quais um igual à testemunha e outro com valores superiores aos da testemunha.

Os tratamentos DFs185/306, DFs185, DFs416 e DFs418 formaram o grupo com maior redução de danos em relação aos sintomas (3,4 vezes menos galhas) e também figuraram no grupo de maior redução do

Tabela 2. Número de galhas, número de ovos, fator de reprodução (FR), percentual de controle (PC), massa de matéria fresca radicular (MFR), massa de matéria seca da parte aérea (MSA) de plantas originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados e combinações de rizobactérias, cultivadas em solo infestado com *Meloidogyne graminicola*, em casa de vegetação⁽¹⁾.

Tratamento	Número de galhas	Variação ⁽²⁾ (%)	Número de ovos	Variação (%)	FR	PC	MFR (g)	Variação (%)	MAS (g)	Variação (%)
DFs185/306	65d	69	58.750c	61	11,8c	61	6,0b	-31	2,2b	-8
DFs185/416	94c	55	67.777c	56	13,6c	56	8,0b	-8	2,7a	13
DFs185/418	100c	52	72.639c	52	15,3c	50	10,0a	15	2,8a	17
DFs306/416	89c	57	65.416c	57	13,0c	57	9,3a	7	2,7a	13
DFs306/418	95c	55	72.638c	52	14,5c	52	8,4a	-3	2,8a	17
DFs416/418	106c	49	76.111c	50	15,2c	50	10,4a	20	2,8a	17
DFs185/306/416	80c	62	66.389c	56	13,3c	56	3,4b	-61	1,8b	-25
DFs185/306/418	98c	53	64.861c	57	12,9c	57	11,9a	37	3,3a	38
DFs185/416/418	146b	30	74.444c	51	14,9c	51	6,8b	-22	2,3b	-4
DFs306/416/418	133b	36	145.277a	5	29,0a	5	10,1a	16	3,0a	25
DFs185/306/416/418	81c	61	129.444a	15	25,9a	15	10,1a	16	2,7a	13
DFs185	57d	73	78.611c	48	15,7c	48	6,5b	-25	1,9b	-21
DFs223	98c	53	92.222c	39	18,4c	40	7,6b	-13	2,5a	4
DFs306	89c	57	104.861b	31	20,9b	31	9,3a	7	3,1a	29
DFs416	65d	69	62.638c	59	12,5c	59	7,1b	-18	2,3b	-4
DFs418	60d	71	60.000c	61	12,0c	61	5,6b	-36	1,8b	-25
T	209a	0	152.361a	0	30,4a	0	8,7a	0	2,4b	0
T - I	-	-	-	-	-	-	7,8b	-10	2,3b	-4
CV (%) ⁽³⁾	13,87		16,06		15,15		32,6		23,95	

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. ⁽²⁾Variação percentual dos valores da variável em comparação aos apresentados pela testemunha. ⁽³⁾Coefficiente de variação dos valores transformados para $(x + 1)^{0.5}$. T, testemunha tratada com salina; T - I, testemunha sem inoculação do patógeno.

número de ovos (2,2 vezes menos) e de reprodução do nematoide (2,14 vezes). Os tratamentos: DFs185/418, DFs306/416, DFs306/418, DFs416/418, DFs185/306/418, DFs306/416/418, DFs185/306/416/418 e DFs306 estão entre os tratamentos do grupo superior, para as duas variáveis de crescimento.

Observando-se o comportamento biocontrolador e promotor de crescimento em conjunto, não houve coincidência entre os melhores tratamentos. Contudo, se forem consideradas as performances intermediárias e significativamente diferentes da testemunha com inoculação, para todas as variáveis, percebe-se a existência de seis tratamentos superiores, dos quais cinco são combinações de rizobactérias (DFs185/418, DFs306/416, DFs306/418, DFs416/418 e DFs184/306/418). Entre todos esses, o único tratamento constituído de uma rizobactéria (DFs306) foi aquele que resultou em menor impacto no fator de reprodução.

Entre as cinco rizobactérias utilizadas no presente trabalho, apenas DFs223 (*P. fluorescens*) foi incompatível com as demais. A incompatibilidade observada está em acordo com a conhecida capacidade de espécies de *Pseudomonas* de sintetizar ampla gama de compostos antimicrobianos (Dowling & O'Gara, 1994). A compatibilidade in vitro foi utilizada por outros autores como forma de selecionar combinações de microrganismos para serem avaliadas in vivo (Mafia et al., 2007; Corrêa et al., 2008), o que se comprovou como estratégia eficiente, já que, para a grande maioria das combinações aqui testadas, não houve perda da eficiência biocontroladora.

Nove tratamentos foram capazes de controlar ambas as doenças, dos quais seis são combinações de rizobactérias, embora de modo geral, o uso destas para o controle de *R. solani* não tenha melhorado o desempenho dos isolados utilizados individualmente. O mesmo fato ocorreu para o controle de *M. graminicola*, em relação às variáveis relacionadas à reprodução (Tabela 2). Todavia, a redução de danos causados pelo nematoide nas raízes (galhas) foi maior quando as rizobactérias foram usadas isoladamente.

Ao se considerar o crescimento das plantas de arroz, observou-se que a presença dos dois patógenos afetou algumas variáveis. A infecção por *R. solani* reduziu o sistema radicular, ao passo que as galhas aumentaram a massa de raízes nas plantas infectadas. Nenhuma das doenças afetou a massa de matéria da parte aérea. No entanto, houve a tendência de maior eficiência na

promoção de crescimento pelo uso das combinações. Essa tendência ocorreu quando se consideraram os diferentes ensaios, em que se destacaram as combinações DFs185/418 e DFs185/306/418, que proporcionaram incremento de todas as variáveis de crescimento para os dois ensaios realizados.

Na análise conjunta do controle dos patógenos e da promoção de crescimento, pode-se afirmar que houve vantagem no uso de algumas combinações, pois ainda que tenham mantido o mesmo nível de controle apresentado pelos isolados, individualmente elas proporcionaram ganhos no crescimento das plantas: DFs185/306, DFs185/416, DFs306/416 e DFs185/306/416/418, quanto à queima-das-bainhas, e DFs185/418, DFs306/416, DFs416/418 e DFs185/306/418, quanto à meloidoginose. Nesse aspecto, a combinação DFs306/416 reduziu as variáveis relacionadas aos sintomas da queima-das-bainhas e à reprodução do nematoide, além de não diferir das plantas sem inoculação ou de ser superior a elas quanto às variáveis de crescimento.

Este trabalho permite afirmar que as rizobactérias utilizadas podem atuar por diferentes mecanismos de ação, o que poderia ampliar as possibilidades de sobrevivência, de controle de patógenos e de promoção de crescimento (Raupach & Kloepper, 1998; Boer et al., 1999). Isto é importante quando se sabe que os isolados de rizobactérias aqui utilizados têm as seguintes características: são capazes de colonizar o sistema radicular de arroz e estabelecer nível populacional necessário para que o biocontrole aconteça; podem atuar por antibiose, pela produção de compostos tóxicos capazes de inibir o crescimento micelial in vitro de pelo menos três dos fungos *Alternaria alternata*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Gerlachia oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *R. solani* e *Sclerotium rolfsii*; podem inibir a eclosão e aumentar a mortalidade de J2 de *M. graminicola*; podem competir por ferro, ao produzir sideróforos (DFs185, DFs223 e DFs418) (Ludwig & Moura, 2009); e, pelo menos o isolado DFs306, pode induzir resistência das plantas de arroz, pois foi capaz de aumentar a produção de enzimas relacionadas à patogênese, em resposta à microbiolização com essa rizobactéria e infecção por *B. oryzae* e *G. oryzae* (Ludwig, 2009).

A diversidade de mecanismos de biocontrole, apresentada pelas diferentes combinações, também pode ter proporcionado controle em diferentes fases

do ciclo de vida do nematoide (Freitas, 2009), uma vez que reduziu tanto o número de ovos e o fator de reprodução do nematóide, quanto o número de galhas nas raízes.

A combinação entre diferentes microrganismos e mecanismos de ação tem resultado em níveis de controle superiores aos obtidos pelo emprego individual deles. Raupach & Kloepper (1998) demonstraram que a combinação de duas ou três das rizobactérias *B. pumilus*, *B. subtilis* e *Curtobacterium flaccumfaciens* aumentou o espectro de ação, bem como a eficiência do controle de três patógenos em pepino (*Colletotrichum orbiculare*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e *Erwinia tracheiphila*), por induzirem resistência e produzirem antibióticos. A combinação entre bactéria (*B. subtilis*) e fungo (*Trichoderma harzianum*) permitiu melhor controle da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), do tombamento de plântulas (*Pythium aphanidermatum*) e da cercosporiose (*Cercospora nicotiana*) em fumo (Maketon et al., 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Anastasiadis et al. (2008), que observaram que o uso combinado de *B. firmus* e *Paecilomyces lilacinus* proporcionou a maior redução no número de ovos nas raízes de tomate infestadas com *Meloidogyne* spp. Também foi observado que a utilização da combinação do fungo micorrízico *Glomus* sp. e da bactéria *Pasteuria penetrans* conferiu maiores benefícios do que quando se utilizou um único organismo, o que proporcionou redução na densidade dos juvenis de *M. incognita* em 57 e 61%, nas duas cultivares de tomate, além de maiores incrementos no crescimento das plantas e na produção de frutos (Talavera et al., 2002).

O ganho no controle de doenças, pelo uso de combinações, já foi relatado quanto a patógenos do arroz. No patossistema *R. solani*-arroz, o uso de isolados de *Streptomyces* spp. e *B. cereus*, conhecidos produtores de quitinase, em combinação com isolados de *P. fluorescens* e *Burkholderia cepacia*, produtores de antibióticos, resultou em maior controle do patógeno (Mafia et al., 2007). Os benefícios da estratégia da utilização de combinações de isolados biocontroladores também foram mostrados por Commare et al. (2002), que trabalharam com uma formulação à base de dois isolados de *P. fluorescens*, suplementada com quitina, e relataram redução de 63% na severidade da queima-das-bainhas em arroz.

Alguns tratamentos proporcionaram controle dos patógenos, porém houve pequeno ou nenhum aumento de algumas variáveis de crescimento, ou ainda, valores inferiores aos proporcionados pela testemunha. Isso pode ser explicado pelo possível deslocamento de energia para a proteção da planta contra o patógeno (Stadnik & Buchenauer, 1999) ou, ainda, por competição por espaço e nutrientes (Paulitz, 1990).

A maior massa de raízes infectadas por *M. graminicola*, observada em alguns tratamentos, pode ser creditada às mudanças neoplásticas no sistema radicular, que aumentaram sua massa em relação a raízes sadias, conforme Tihohod (1993). Segundo este autor, em muitos casos, um número anormal de raízes laterais prolifera das galhas, o que ocasiona maior volume radicular. Isto está de acordo com Steffen (2007), que tratou da possibilidade de a maior massa de matéria fresca da raiz, observada em plantas de arroz da cultivar IRGA-420, suscetível ao nematoide-das-galhas, ter ocorrido em razão do maior número de galhas presentes.

Embora as rizobactérias utilizadas no presente trabalho tenham sido efetivas para o controle de diferentes patógenos, em diferentes anos de experimentação, quando usadas isoladamente, elas mostraram irregularidade de eficiência (Ludwig & Moura, 2007; Ludwig, 2009; Ludwig et al., 2009). A inconsistência de biocontrole, sob diferentes condições de ambiente e de cultivo, e a diversidade da população do patógeno são amplamente relatadas (Oliveira et al., 2006; Corrêa et al., 2008). Esse comportamento irregular justifica o uso de combinações de biocontroladores compatíveis, pois, assim, poderá ser alcançado melhor desempenho no campo. A regularidade de desempenho está calcada na diversidade genética, o que resulta em tratamentos persistentes na rizosfera, aumenta a estabilidade e a efetividade do biocontrole sobre vários isolados do mesmo patógeno ou, ainda, outros patógenos, e reduz as limitações de uso de um único biocontrolador no campo (Raupach & Kloepper, 1998; Boer et al., 1999).

De modo geral, os resultados apresentados neste trabalho mostram que vários tratamentos com rizobactérias possuem potencial para o controle de *R. solani*, *M. graminicola* e para a promoção de crescimento de arroz. O maior controle e a promoção de crescimento do arroz, proporcionado pelas combinações de rizobactérias, justifica considerá-las para uso na orizicultura; no entanto, há que se avaliar seu comportamento na lavoura.

Conclusão

Combinações de rizobactérias, quando usadas para microbiolizar sementes de arroz, aumentam o espectro de ação no controle dos patógenos *Rhizoctonia solani* e *Meloidogyne graminicola* e permitem o biocontrole associado à promoção de crescimento.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por disponibilizar recursos para a elaboração deste trabalho e pela concessão de bolsa de produtividade; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsas.

Referências

- ANASTASIADIS, I.A.; GIANNAKOU, I.O.; PROPHETOU-ATHANASIADOU, D.A.; GOWEN, S.R. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. **Crop Protection**, v.27, p.352-361, 2008.
- BOER, M. de; BOM, P.; KINDT, F.; KEURENTJES, J.J.B.; SLUIS, I. van der; LOON, L.C. van; BAKKER, P.A.H.M. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. **Phytopathology**, v.93, p.626-632, 2003.
- BOER, M. de; SLUIS, I. van der; LOON, L.C. van; BAKKER, P.A.H.M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.201-210, 1999.
- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S. das; GIGLIOTI, É.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, p.18-24, 2001.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, p.35-44, 2001.
- COMMARE, R.R.; NANDAKUMAR, R.; KANDAM, A.; SURESH, S.; BHARATHI, M.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. **Crop Protection**, v.21, p.671-677, 2002.
- CORRÊA, B.O.; MOURA, A.B.; DENARDIN, N.D.; SOARES, V.N.; SCHAFER, J.T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p.156-163, 2008.
- DOWLING, D.N.; O'GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Trends in Biotechnology**, v.12, p.133-141, 1994.
- FREITAS, L.G. **Rizobactérias versus nematóides**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2009.
- HUSSEY, R.S.; BAKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* species, including a new technique. **Plant Disease Report**, v.57, p.1025-1028, 1973.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- LUDWIG, J. **Potencial de isolados bacterianos como biocontroladores de nematoides e fungos e como indutores de resistência em plantas de arroz**. 2009. 104p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.381-386, 2007.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B. Controle biológico de *Bipolaris oryzae* em arroz irrigado. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.317-330.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B.; SANTOS, A.S. dos; RIBEIRO, A.S. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaudadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.322-328, 2009.
- MAFFIA, A.L. **Programa para cálculo de área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) GW-BASIC 3.20**. Viçosa: UFFV, 1986.
- MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.M.; SIQUEIRA, L. de. Compatibilidade e efeito da mistura de isolados de rizobactérias na indução do enraizamento e crescimento de clones de eucalipto. **Revista Árvore**, v.31, p.635-643, 2007.
- MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* ap-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.296-300, 2008.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.603-612, 2001.
- NUNES, C.D.; RIBEIRO, A.S.; TERRES, A.L. Principais doenças do arroz irrigado e seu controle. In: GOMES, A.S.; MAGALHÃES JUNIOR, A.M. de (Ed.). **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.579-633.
- OLIVEIRA, A. de; SANTOS, M.H.M. dos; SILVEIRA, E.B. de; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R. de L.R. Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.373-377, 2006.

- 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, p.971-977, 2007.
- PAULITZ, T.C. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In: BAKER, R.R. (Ed.). **New directions in biological control**: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. New York: Liss, 1990. p.713-724.
- RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p.1158-1164, 1998.
- ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279p.
- SORIANO, I.R.; REVERSAT, G. Management of *Meloidogyne graminicola* and yield of upland rice in South-Luzon, Philippines. **Nematology**, v.5, p.879-884, 2003.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Fertilidade do Solo – RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3.ed. Pelotas: SBCS, 1999. 223p.
- STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivate and modern fungicides. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.106, p.476-489, 1999.
- STEFFEN, R.B. **Caracterização, controle alternativo e reprodução de *Meloidogyne graminicola* em cultivares de arroz irrigado submetidos a diferentes regimes de umidade**. 2007. 96p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- TALAVERA, M.; ITOU, K.; MIZUKUBO, T. Combined application of *Glomus* sp. and *Pasteuria penetrans* for reducing *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations and improving tomato growth. **Applied Entomology and Zoology**, v.37, p.61-67, 2002.
- TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372p.

Recebido em 23 de abril de 2010 e aprovado em 22 de outubro de 2010