

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E BIOCONTROLE DA MANCHA-PARDA POR  
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE ARROZ

Bruna Canabarro Pozzebon  
Engenheira Agrônoma/UNIPAMPA

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Fevereiro de 2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Canabarro Pozzebon, Bruna  
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E BIOCONTROLE DA MANCHA-  
PARDA POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE ARROZ / Bruna  
Canabarro Pozzebon. -- 2015.  
58 f.

Orientador: Roberto Lanna Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa  
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2015.

1. Controle Biológico. 2. Promoção de Crescimento.  
3. Bactérias endofíticas. I. Lanna Filho, Roberto,  
orient. II. Título.

BRUNA CANABARRO POZZEBON  
Engenheira Agrônoma - UNIPAMPA

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 18.02.2015  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 25.08.2015  
Por

ROBERTO LANNA FILHO  
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

MARILIA LAZAROTTO  
PPG Fitotecnia/UFRGS

ANDREIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA  
FEPAGRO - Porto Alegre/RS

CLAUDIO OGOSHI  
IRGA - Cachoeirinha/RS

PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

Aos meus pais, *Benjamin e Lourdes*, com todo amor do mundo, dedico este trabalho, pelo apoio, incentivo, carinho e afeto que me deram desde o início.  
À minha irmã, *Priscila*, por estar sempre ao meu lado.

*DEDICO*

*“Não basta a arte, nem basta a ciência. É indispensável a paciência.”*  
(J. W. von Goethe)

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, especialmente meus pais, Benjamin Francisco Pozzebon e Maria de Lourdes Canabarro Pozzebon, e irmã, Priscila Canabarro Pozzebon, por me ensinarem o significado da saudade, do amor supremo e da humildade... pela preocupação, carinho e apoio incondicional na profissão que escolhi, pelo incentivo à busca de meus sonhos e objetivos, por estarem presentes nos momentos difíceis, sempre incentivando a dar o melhor de mim em qualquer coisa que eu me proponha a fazer.

À Deus, por guiar e não permitir fraquejar nos momentos difíceis, por conceder a realização deste sonho e colocar pessoas especiais no meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Roberto Lanna Filho, pelos ensinamentos, amizade, paciência, apoio e incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional, e acima de tudo pela confiança e orientação durante esses dois anos.

Aos meus amigos e colegas de departamento, em especial à Yuliet F. Cardoso, Angel R. Stopilha, Marciele Barbieri, Sara Hartke, Priscila Saraiva, Ismail T. Júnior, Tiago Einolf e Fernando Bueno, pelo companheirismo, amizade, convivência e ajuda nos experimentos.

À minha querida amiga e confidente, Priscila Paris, que inúmeras vezes parou tudo para me oferecer uma palavra de carinho, dando apoio nos momentos difíceis. Obrigada pela tua amizade, e por ser meu ombro amigo aqui!

Aos amigos que me acompanham desde a graduação, André R. Zeist, Priscila V. Ramos, Keilor R. Dorneles, Marlon Bastiani e Janete Munareto, pela amizade sólida que construímos há sete anos, que sobrevive à qualquer distância e a qualquer problema... Que possamos conservar esse carinho e amor que temos uns pelos outros independente de qualquer coisa.

Às minhas irmãs de coração, Mariana Vargas Muccini e Vanisa Fante Viappiana, colegas de apartamento que me propiciaram um lar e uma segunda família em Porto Alegre, pela amizade, horas de conversa, por compartilhar e ajudar em momentos difíceis e comemorar comigo cada etapa vencida.

Aos professores pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas da pós, por contribuir significativamente com a minha formação profissional e pessoal.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, que possibilitaram a realização desta importante etapa de minha formação profissional.

Ao Departamento de Fitossanidade e ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal e Biocontrole, pelo suporte na execução dos experimentos.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho. Aos que estiveram comigo, fisicamente ou em pensamento, mandando boas energias e rezando para que tudo desse certo e saísse como o esperado no final. Muito obrigada, de coração, por fazerem parte da realização de mais esse sonho!

# PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E BIOCONTROLE DA MANCHA-PARDA POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE ARROZ

Autor: Bruna Canabarro Pozzebon

Orientador: Roberto Lanna Filho

## RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, porém fatores como doenças de natureza biótica podem acometer a produção de grãos. Este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias endofíticas, autóctones de plantas de arroz, com potencialidade para o biocontrole da mancha-parda, causada por *Bipolaris oryzae*, bem como investigar a capacidade dos isolados em promover o crescimento das plantas. Uma coleção de 303 isolados bacterianos foram obtidos e submetidos a investigações supramencionadas. Para os estudos de promoção de crescimento, foram mensurados o comprimento da raiz principal e o desenvolvimento da parte aérea das plântulas *in vitro* e, a altura das plantas, número de folhas, peso da massa fresca e seca da raiz e parte aérea, em condições de casa-de-vegetação. Também foram avaliados o vigor e a germinação de sementes. No estudo de biocontrole, foi investigada a potencialidade antagônica *in vitro* dos isolados contra o fitopatógeno, bem como a capacidade dos agentes bacterianos em reduzir a severidade da mancha-parda sob condições de casa-de-vegetação. No teste *in vitro*, os resultados obtidos apontaram que 11,5% dos isolados foram promissores para comprimento da raiz e 2,3% se destacaram quanto ao desenvolvimento da parte aérea. Em casa-de-vegetação, nove isolados (49, 52, 160, 193, 267, 274, 277, 282 e 294) se destacaram como potenciais promotores de crescimento. Com relação ao Teste Padrão de Germinação, os tratamentos com GreenForce, PBS e com os isolados 193, 274 e 160, afetaram o vigor de plântulas e os tratamentos com PBS e com o isolado 160, a germinação. Além disso, 25 isolados endofíticos foram eficientes na inibição do crescimento micelial do patógeno, apresentando halos de inibição de até 3,5 cm. Em casa-de-vegetação, 39 isolados diferiram do controle, reduzindo a severidade da doença, em média 89,75%. Em suma, os estudos demonstraram que os isolados das bactérias endofíticas testadas foram promissores para o crescimento das plantas de arroz, bem como apresentaram bom potencial para o biocontrole da mancha-parda.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (58p.) Fevereiro, 2015.

# GROWTH PROMOTION AND BIOCONTROL BROWN SPOT BY BACTERIA ENDOPHYTIC RICE <sup>1</sup>

Author: Bruna Canabarro Pozzebon

Advisor: Roberto Lanna Filho

## ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is the second most cultivated cereal in the world, but factors such as biotic nature of diseases can affect the production of grains. This work aimed to select endophytic, indigenous bacteria of rice plants, with potential for biocontrol of brown spot, caused by *Bipolaris oryzae*, and promotion of growth of rice plants. A collection of 303 bacterial isolates were obtained and submitted the abovementioned investigations. For studies to promote growth, we measured the length of the main root and shoot growth of seedlings *in vitro* and, plant height, leaf number, weight of fresh and dry weight of roots and shoots, in greenhouse conditions. We also evaluated the vigor and seed germination. In the study of biocontrol, we investigated the *in vitro* antagonistic potential of the isolates against the pathogen, and the ability of bacterial isolates in reducing the severity of brown spot, under greenhouse conditions. The results showed that 11.5% of the isolates were promising to root length and 2.3% had the high development of shoots *in vitro* test. In the greenhouse, nine isolates (49, 52, 160, 193, 267, 274, 277, 282 and 294) stood out as potential growth promoters. With respect to Standard Germination Test (SGT), the treatments with GreenForce, PBS and isolates 193, 274 and 160 affected the vigor of seedlings, however, the treatments with PBS and isolate 160 also affected the seed germination. Furthermore, 25 endophytic isolates were effective in inhibiting mycelial growth of the pathogen, with inhibition zones of up to 3.5 cm. Under greenhouse conditions, 39 isolates differed from the control, reducing the severity of the disease, on average 89.75%. In short, the studies showed that the isolates of endophytic bacteria tested were promising for the growth of rice plants and have good potential for biocontrol of brown spot.

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (58p.) February, 2015.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	6
3. PRIMEIRO ARTIGO: Bactérias endofíticas como agentes promotores de crescimento em plantas de arroz .....	10
3.1 Introdução.....	12
3.2 Material e Métodos.....	13
3.2.1 Isolamento das bactérias endofíticas.....	13
3.2.2 Cultivo e preservação das bactérias endofíticas.....	14
3.2.3 Microbiolização de sementes.....	14
3.2.4 Bioensaio <i>in vitro</i> .....	15
3.2.5 Bioensaio em casa-de-vegetação.....	15
3.2.6 Teste Padrão de Germinação.....	16
3.2.7 Identificação das bactérias: extração do DNA e amplificação do fragmento gênico 16S rDNA.....	17
3.3 Resultados.....	18
3.4 Discussão.....	20
3.5 Conclusões.....	24
3.6 Referências Bibliográficas.....	25
4. SEGUNDO ARTIGO: Bactérias endofíticas de arroz como agentes de biocontrole da mancha-parda .....	36
4.1 Introdução.....	38
4.2 Material e Métodos.....	39
4.2.1 Isolamento das bactérias endofíticas.....	40
4.2.2 Cultivo e preservação dos micro-organismos.....	40
4.2.3 Microbiolização de sementes.....	41
4.2.4 Bioensaio de antibiose.....	41
4.2.5 Preparo das plantas em casa-de-vegetação.....	42
4.2.6 Inoculação do patógeno.....	42
4.2.7 Análise estatística.....	43
4.2.8 Identificação das bactérias: extração do DNA e amplificação do fragmento gênico 16S rDNA.....	43
4.3 Resultados.....	44
4.4 Discussão.....	45
4.5 Conclusões.....	47
4.6 Referências Bibliográficas.....	49
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58

## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

### PRIMEIRO ARTIGO

- 1 Altura de plantas, número de folhas, massa fresca da parte aérea e raiz, massa seca da parte aérea e raiz, quando comparadas com os tratamentos controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM), e GreenForce..... 34
- 2 Vigor (%) e germinação (%) de sementes de arroz em resposta à microbiolização de sementes com bactérias endofíticas autóctones de arroz..... 35

### SEGUNDO ARTIGO

- 1 Atividade inibitória de 25 isolados endofíticos dentre os 303 isolados testados contra o patógeno desafiante *B. oryzae*. Em vista de comparação, também foram testados os tratamentos: água (controle negativo), solução tampão-fosfato PBS, GreenForce, ASM e fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram)..... 54
- 2 Severidade da mancha-parda (Sev) em folhas de arroz em casa-de-vegetação, órgão do hospedeiro (OH) em que foram isoladas as endofíticas e avaliação da presença ou ausência de halo de inibição micelial, decorrente dos tratamentos com os isolados endofíticos, PBS, ASM, GreenForce (GF), Fungicida (Fung: Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram) e água (controle)..... 56

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

### PRIMEIRO ARTIGO

- 1 Comprimento da raiz principal de plântulas de arroz, originadas de sementes microbiolizadas com bactérias endofíticas, Controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM) e GreenForce (GF). As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ )..... 30
- 2 Comprimento da parte aérea de plântulas de arroz, originadas de sementes microbiolizadas com bactérias endofíticas, Controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM) e GreenForce (GF). As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ )..... 31
- 3 Isolados mais eficientes para o crescimento de raiz e de parte aérea de arroz, e tratamentos controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM) e GreenForce (GF). As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ )..... 32
- 4 Crescimento do sistema radicular e parte aérea, após 4 dias de exposição das sementes aos seguintes tratamentos: A – Controle (água), B - Solução Tampão-Fosfato (PBS) (0,1 M), C – Acibenzolar-S-metil (ASM), D – GreenForce, E – 209, F - 319. (Barras = 1 cm)..... 33

### SEGUNDO ARTIGO

- 1 Antibiose *in vitro* e severidade em casa-de-vegetação. Halo de inibição dos isolados com maior atividade antagônica ao patógeno *B. oryzae*. A – Halo de inibição do isolado 191 (3,50 cm). B – Halo de inibição do isolado 164 (3,18 cm). C – Ausência de halo de inibição nos tratamentos controle (água), ASM, PBS e GreenForce e presença de halo (1,50 cm) no tratamento com fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram) (Fung.). Severidade da mancha-parda em folhas de arroz com 21 dias de idade. D – Tratamento controle (água), considerado como 100% de doença. E – Tratamento com a bactéria endofítica 286, considerada uma das mais eficientes..... 55

- 2 Inibição do crescimento micelial e redução da severidade de mancha-parda pelos isolados 236, 335 e 80, comparativamente com os tratamentos controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM), GreenForce (GF) e Fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram). As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).....

57

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas. De importância relevante na nutrição humana, estima-se que o consumo médio mundial desse cereal é próximo de 60 kg/pessoa/ano. Nas Américas, o Brasil se destaca como o maior consumidor, com o consumo *per capita* em torno de 45 kg/ano (SOSBAI, 2012).

Mundialmente, a área de cultivo do arroz compreende 158 milhões de hectares com uma produção de 489 milhões de toneladas. Cerca de 90% do arroz produzido no mundo é originário do continente Asiático. Na América Latina, o Brasil é o maior produtor, responsável pela produção de 11.600 milhões de toneladas, participando com cerca de 82% da produção do MERCOSUL (SOSBAI, 2012; FAOSTAT, 2013). O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional, com área cultivada na safra 2013/2014 de 1.116,7 mil hectares (CONAB, 2013; FAOSTAT, 2013). A expectativa de produção para a safra 2014/2015 é de 8.289,9 mil toneladas, representando um incremento de 2,2% em relação à safra passada (CONAB, 2014). O papel econômico-social exercido por essa atividade é de suma importância para o estado, pois engloba 133 municípios, com participação de 232 mil pessoas vivendo direta ou indiretamente da orizicultura (SOSBAI, 2012).

No entanto, alguns fatores podem acometer a produção de arroz, com destaque para as doenças de natureza biótica que podem causar grandes prejuízos quando ocorrem em períodos de florescimento e enchimento dos grãos, momento em que são definidos o número de espiguetas férteis por panículas, peso de grãos e percentual de grãos inteiros (Grohs *et al.*, 2010; SOSBAI, 2010). No tocante a mancha-parda do arroz, causada pelo patógeno *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [teleomorfo = *Cochliobolus miyabeanus* (Ito e

Kuribayashi) Drechs. ex Dastur.], é conspícuo a importância da doença para a orizicultura brasileira por causar reduções vultosas de produtividade nas principais regiões produtoras de arroz no Brasil. A doença pode causar infecção nos grãos, redução na germinação de sementes, morte de plântulas e destruição da área foliar. É uma doença crônica, que afeta milhões de hectares de arroz a cada estação de cultivo (Barnwal *et al.*, 2013) e encontra-se amplamente distribuída nas principais regiões orizícolas do mundo. Particularmente, a mancha-parda ocorre em ambientes com solos degradados e com deficiências de minerais, principalmente de potássio, em plantas com estresse hídrico e com desequilíbrio nutricional (Faria & Prabhu, 1983; Khalili *et al.*, 2012; Barnwal *et al.*, 2013).

Há relatos de perdas, no rendimento de grãos, que alcançaram níveis estimados em 90%, neste caso, a doença assume proporções epidêmicas como as observadas na famosa “fome de Bengala” em 1942 (Sunder *et al.*, 2014). Além disso, a enfermidade afeta a qualidade e o número de grãos por panícula e contribui para a redução do peso das sementes produzidas (Manimegalai *et al.*, 2011). Ba & Sangchote (2006) avaliaram a intensidade da mancha-parda em arroz e demonstraram que a incidência de grãos infectados foi de 26% na fase de maturação de grãos e a severidade em folhas foi de 1,6%. Em contrapartida, nas fases de floração e grão leitoso, a incidência de grãos infectados foram 15,1% e 12,4%, respectivamente. Adicionalmente, a severidade em folhas nessas fases foram 0,6% e 0,4%, respectivamente. Assim, os autores comprovaram que a incidência e a severidade da mancha-parda aumentaram de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta.

O controle da doença é baseado em alternativas de manejo utilizando a pulverização com fungicidas, uso de cultivares resistentes, uso de sementes sadias ou tratadas, manejo da fertilização e da irrigação, visando reduzir os danos provocados pelo patógeno (Moletti *et al.*, 1988; Georgopoulos & Ziogas, 1992; Bedendo & Prabhu, 2005; Ghazanfar *et al.*, 2009). No entanto, o controle químico contamina o ambiente, expõe quem aplica o produto, resulta em desequilíbrio ambiental, eleva os custos de produção, e a vida útil das cultivares resistentes muitas vezes não é longa (Schafer, 2011). Dessa forma, o biocontrole por microorganismos, em especial exercido por bactérias endofíticas, pode ser uma estratégia adicional e mais eficiente no manejo da mancha-parda, podendo

reduzir ou eliminar o uso intensivo de fungicidas reduzindo os custos de produção.

Habitantes comuns dos tecidos internos de diversas espécies de plantas (Strobel *et al.*, 2004), as bactérias endofíticas podem ser uma alternativa aos métodos de controle praticados atualmente. Isso porque são capazes de prevenir ou reduzir efeitos deletérios causados por patógenos a partir da ação de múltiplos mecanismos de biocontrole (Compant *et al.*, 2010; Lanna Filho, 2011), desempenhados pela síntese de sideróforos, voláteis, substâncias antimicrobianas, competição por espaço/nutrientes e resistência sistêmica (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Adicionalmente, podem promover efeitos adicionais à planta, tais como: resistência ao estresse abiótico (Sziderics *et al.*, 2007) e ataque de insetos (Azevedo *et al.*, 2000), promoção de crescimento (Adhikari *et al.*, 2001) e fitorremediação (Germaine *et al.*, 2006).

A interação de bactérias endofíticas associadas a tecidos internos de plantas saudáveis tem sido objeto de estudo em todo o globo, visando elucidar os mecanismos de proteção e crescimento por elas promovidos (Rosembueth & Martínez-Romero, 2006; Ryan *et al.*, 2008). Notadamente, esses microorganismos apresentam vantagem adicional em comparação a outros, pois são protegidos contra flutuações bruscas de temperatura, dessecação, radiações solares e competição microbiana, por habitarem o interior do hospedeiro (Francis *et al.*, 2010). Como promotoras de crescimento de plantas, podem trazer benefícios por fornecer vitaminas essenciais à planta, aumento da captação e solubilização de minerais, ajuste osmótico, regulação dos estômatos e modificação da morfologia radicular (Ryan *et al.*, 2008). Os efeitos à planta podem incluir o aumento da altura e área foliar, aumento do sistema radicular e produtividade, rápido crescimento e desenvolvimento, que resultam em um ganho geral de biomassa (Sturtz, 1995; Pillay & Nowak, 1997). Isso foi demonstrado por Barretti *et al.* (2008), os quais avaliaram a habilidade do isolado UFV-E49 que proporcionou os maiores aumentos em altura (23,40%), área foliar (105,80%), número de folhas (19,53%), peso da matéria fresca (42,40%) e peso da matéria seca da parte aérea (61,64%), peso da matéria fresca (100%) e peso da matéria seca das raízes (225%) de tomateiro, quando comparados à testemunha.

No tocante ao biocontrole, estudos têm demonstrado o sucesso do uso de bactérias endofíticas contra diversos patógenos, devido à capacidade de reduzir

ou prevenir os efeitos deletérios dos patógenos, tais como *Gaeumannomyces graminis* em trigo (*Triticum aestivum* L.) (Coombs *et al.*, 2004), *Xylella fastidiosa* em citros (*Citrus* sp. L.) (Araújo *et al.*, 2002), *Meloidogyne incognita* em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), (Hallmann *et al.*, 2001), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) (Assis *et al.*, 1998), *Phytophthora nicotianae* em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Coventry & Dubery, 2001), dentre outros. Silva *et al.* (2008) demonstraram que para mudas de café (*Coffea arabica* L.), tratadas com o isolado 119G, a redução na severidade da ferrugem do cafeeiro foi acima de 60%. Entretanto o emprego de bactérias endofíticas no controle de doenças depende do sucesso do binômio endofítica-planta, pois agentes bióticos e abióticos podem reduzir a eficiência do controle, inviabilizando a sua utilização (Lanna Filho, 2011).

Em outro estudo realizado por Lanna Filho *et al.* (2013 a), em tomateiro, ficou demonstrado a capacidade das bactérias endofíticas *Bacillus pumilus* e *Bacillus amyloliquefaciens*, em controlar eficientemente a pinta-bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Os autores verificaram que, ao pulverizarem as endofíticas sobre plantas de tomate, houve uma redução significativa no número de lesões da doença, assim demonstrando que esses organismos podem ser utilizados via outros métodos de aplicação. Adicionalmente, em outro estudo (Lanna Filho *et al.*, 2013 b), observaram que proteínas sintetizadas pelas mesmas bactérias induziram resistência em plantas de tomate contra *Xanthomonas vesicatoria*, em que o controle da mancha-bacteriana chegou a níveis de 63,5%, quando comparado ao tratamento controle.

O uso de bactérias endofíticas na agricultura se apresenta como uma boa alternativa de manejo ao controle de doenças e promoção de crescimento de plantas, devido à relação custo/benefício para o produtor. Isso porque reduz o uso excessivo de agrotóxicos, o que conseqüentemente corrobora para a redução dos custos de produção. Todavia, o uso desses micro-organismos ainda precisa ser amplamente estudado, para que se possa conhecer e elucidar os mecanismos de ação envolvidos no biocontrole e promoção de crescimento de plantas. Um dos maiores desafios seria manter a ação efetiva dessas populações de bactérias endofíticas em diferentes condições e/ou manter sua viabilidade, através de conhecimentos sobre a ecologia dessas populações e suas interações moleculares (Lanna Filho, 2011).

Embora sejam realizados estudos com bactérias endofíticas no mundo (Sun *et al.*, 2008), no Brasil, os poucos estudos se concentram em bactérias endofíticas diazotróficas (Mattos *et al.*, 2008), com ênfase em outras culturas, como por exemplo, milho (*Zea mays* L.) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Em especial, para a cultura do arroz, estudos visando o biocontrole de *B. oryzae* por bactérias endofíticas seriam inéditos e de grande interesse agrônomo. Além de poderem ser utilizados nas práticas de manejo do arroz convencional e orgânico, o uso desses agentes têm como objetivo final a obtenção de um alimento mais saudável, visando respeitar os aspectos ambientais e sociais. Notadamente, por ser o arroz orgânico um produto diferenciado no mercado, e haver restrições no uso de agroquímicos na condução de suas práticas de manejo, o emprego de bactérias endofíticas entraria como mais uma alternativa aos métodos de controle de doenças. A demanda por esse tipo arroz é bem maior que a oferta, o que cria um mercado promissor para os produtores do cereal (Silveira *et al.*, 2012). Somada às benesses no controle de doenças, a investigação da capacidade promotora de crescimento por bactérias endofíticas, em arroz, pode desencadear o desenvolvimento futuro de um biofertilizante para ganhos de produção.

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com essas duas temáticas, haja vista a crescente exigência dos consumidores por alimentos livres de contaminações por agrotóxicos e preocupados com a preservação do meio ambiente. Em adição, há uma busca constante dos produtores rurais por menores custos de produção e um manejo mais sustentável das práticas agrícolas em suas lavouras. A fim de elucidar a associação de bactérias endofíticas em arroz e ampliar as possibilidades do emprego desses agentes nas lavouras de arroz do Brasil, o estudo proposto teve o objetivo de selecionar bactérias endofíticas, autóctones de plantas de arroz, com potencialidade para o biocontrole da mancha-parda e promoção de crescimento.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, T. B. *et al.* Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 10, p. 916-924, 2001.

ARAÚJO, W. L. *et al.* Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002.

ASSIS, S. M. P. *et al.* Bactérias endofíticas: método de isolamento e potencial antagonico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, p. 216-220, 1998.

AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BA, V. V.; SANGCHOTE, S. Seed borne and transmission of *Bipolaris oryzae*, the causal pathogen of brown spot of rice. **Kasetsart Journal: Natural Sciences**, Bangkok, v. 40, n. 2, p. 353–360, 2006.

BARNWAL, M. K. *et al.* A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 136, n. 3, p. 443–457, 2013.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 731–739, 2008.

BEDENDO, I.; PRABHU, A. Doenças do arroz (*Oryza sativa*). In: KIMATI, H. *et al.* (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. p. 79-90.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, terceiro levantamento, dezembro 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2013. 77 p. (Publicação mensal).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, terceiro levantamento, dezembro 2014 / Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2014. 105 p. (Publicação mensal).

COOMBS, J. T.; MICHELSEN, P. P.; FRANCO, C. M. M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 3, p. 359-66, 2004.

COVENTRY, H. S.; DUBERY, I. A. Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, n. 4, p. 149-58, 2001.

FAOSTAT. **Base de dados da produção e comércio agrícola mundial**. 2013. In: FAO statistical database. Disponível em: <<http://migre.me/d8uYE>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

FARIA, J. C.; PRABHU, A. S. Relação entre fertilização nitrogenada e mancha-parda do arroz em solos de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 12, p.1377-1379, 1983.

FRANCIS, I.; HOLSTERS, M.; VEREECKE, D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2010.

GEORGOPOULOS, S.; ZIOGAS, B. **Principles and methods for control of plant diseases**. Athens: [s.n.], 1992. 236 p.

GERMAINE, K. J. *et al.* Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 302-310, 2006.

GHAZANFAR, M. *et al.* Influence of various fungicides on the management of rice blast disease. **Mycopathologia**, The Hague, v. 7, n. 1, p. 29-34, 2009.

GROHS, D. S. *et al.* **Critérios para o manejo de doenças no arroz irrigado**. Cachoeirinha: IRGA, 2010. 48 p. (Boletim técnico, 7).

HALLMANN, J. *et al.* Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. **Biological control**, San Diego, v. 91, n. 4, p. 415–422, 2001.

KHALILI, E. *et al.* Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 297-305, 2012.

LANNA FILHO, R. **Controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* GFP-marcada) bacteriana do tomateiro por isolados endofíticos de *Bacillus* sp.** 2011. 108 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

LANNA FILHO, R. *et al.* Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. **Australasian Plant Pathology**, Glen Osmond, v. 42, n. 6, p. 643–651, 2013. a.

LANNA FILHO, R. *et al.* Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 295-302, 2013. b.

MANIMEGALAI V.; AMBIKAPATHY, V.; PANNEERSELVAM, A. Biological control of paddy brown spot caused by *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan). **European Journal of Experimental Biology**, Coden (USA), v. 1, n. 4, p. 24-28, 2011.

MATTOS, K. A. *et al.* Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 477–493, 2008.

MOLETTI, M. *et al.* Chemical control trials against rice blast in Italy. **Informatore Fitopatologico**, Italie v. 38, p. 41-47, 1988.

PILLAY, V. J.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 4, p. 354-361, 1997.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

RYAN, R. P. *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.

SCHAFER, J. T. **Indução de resistência por rizobactérias como mecanismo de controle biológico de doenças do arroz.** 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade – Fitopatologia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

SILVA, H. S. A. *et al.* Bactérias endofíticas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 049-054, 2008.

SILVEIRA, V. M.; ANTUNES, G. M.; DIAS, M. F. P. Inovação em sistemas de produção de arroz orgânico no Rio Grande do Sul. **Revista de Administração da UFSM**, Santa Maria, v. 5, Edição Especial, p. 715-728, 2012.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil.** Porto Alegre, RS: SOSBAI, 2010. 179 p.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil.** Itajaí, SC: SOSBAI, 2012. 188 p.

STROBEL, G. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 67, n. 2, p. 257-568, 2004.

STURTZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 175, n. 2, p. 257-263, 1995.

SUN, L. *et al.* Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, n. 3, p. 415-424, 2008.

SUNDER, S.; SINGH, R.; AGARWAL, R. Brown spot of rice: an overview. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 67, n. 3, p. 201-215, 2014.

SZIDERICS, A. H. *et al.* Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 11, p. 1195-1202, 2007.

### **3 PRIMEIRO ARTIGO**

#### **Bactérias endofíticas como agentes promotores de crescimento em plantas de arroz**

Preparado de acordo com normas de Tropical Plant Pathology (Versão preliminar)

Bruna Canabarro Pozzebon<sup>1</sup>, Roberto Lanna Filho<sup>1</sup>, Angel Rafaela Stopilha<sup>1</sup>,  
Priscila Silveira Saraiva<sup>1</sup>, Sara Hartke<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor para correspondência: Bruna Canabarro Pozzebon, e-mail:  
bcpozzebon@gmail.com

## Resumo

Bactérias endofíticas promovem o crescimento de plantas através da solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e fornecimento de vitaminas. Uma coleção de 303 isolados endofíticos, autóctones de arroz, foram avaliados quanto à capacidade de promover o crescimento de plantas, estimular a germinação e aumentar o vigor de sementes. Os ensaios foram conduzidos sob condições laboratoriais e de casa-de-vegetação. Na promoção de crescimento *in vitro*, foram mensurados o comprimento da raiz principal e o desenvolvimento da parte aérea das plântulas. Para tanto, sementes foram previamente microbiolizadas com suspensões bacterianas. Os melhores isolados *in vitro* foram testados em condições de casa-de-vegetação, na qual a altura das plantas, número de folhas, peso da massa fresca e seca da raiz e parte aérea foram avaliadas. Paralelamente, foi conduzido o Teste Padrão de Germinação (TPG), para determinar a qualidade fisiológica das sementes após exposição às suspensões bacterianas. No teste *in vitro* os resultados obtidos apontaram que 11,5% dos isolados foram promissores para o aumento do comprimento da raiz e 2,3% para o aumento da parte aérea. Em casa-de-vegetação, nove isolados se destacaram como potenciais promotores de crescimento e, no Teste Padrão de Germinação (TPG), os isolados 193, 274 e 160, afetaram o vigor de plântulas e o isolado 160, a germinação.

**Palavras-chave:** germinação, altura de plantas, sementes, vigor.

### 3.1 Introdução

Bactérias endofíticas são micro-organismos capazes de promover o crescimento de plantas através da solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e fornecimento de vitaminas. Além disso, desencadeiam mecanismos que aumentam consideravelmente a capacidade da planta em metabolizar essas substâncias para o direcionamento de diferentes processos fisiológicos (Shishido *et al.*, 1999; James *et al.*, 2002). Contudo, esses mecanismos somente terão sucesso, se os agentes endofíticos forem capazes de se estabelecer no vegetal, ocupando nichos específicos, multiplicando e superando os impedimentos físicos e químicos impostos pela planta (Kuss, 2006).

Gêneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia* e *Ochrobactrum*, podem solubilizar complexos de fosfato pela secreção de ácidos orgânicos. Uma vez na forma solúvel, esses fosfatos poderão ser absorvidos pela bactéria ou pela planta (Costa, 2012) e atuar na promoção do crescimento vegetal (Babalola, 2010). Bactérias promotoras de crescimento, como as dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Enterobacter* e *Agrobacterium* (Yuan *et al.*, 2010), produzem compostos indólicos, como ácido indol acético (AIA). Essa substância, sintetizada e exportada pela bactéria, age como hormônio de crescimento vegetal e induz o aumento das raízes e folhas das plantas (Babalola, 2010; Hayat *et al.*, 2010). Tariq *et al.* (2014) realizaram experimentos *in vitro* com bactérias endofíticas em associação com plantas de ervilha e provaram que seis isolados foram capazes de produzir AIA, dois foram capazes de fixar nitrogênio e nove solubilizaram fósforo inorgânico.

Estudos conduzidos por Ji *et al.* (2014) demonstraram que, bactérias endofíticas diazotróficas autóctones de arroz, proporcionaram maior crescimento das plantas e acréscimo no peso seco. Além disso, promoveram efeitos antagônicos contra fungos patogênicos. Quecine *et al.* (2012) também verificaram acúmulo de biomassa em plantas de cana-de-açúcar tratadas com a endofítica *Pantoea agglomerans*, tanto da parte aérea quanto da raiz. Inúmeros estudos reportam a ação promotora de crescimento das bactérias endofíticas em culturas de importância econômica (Varma *et al.*, 1999; Mucciarelli *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2012; Jesus, 2013; Hidayat *et al.*, 2014), o que torna esses agentes agronomicamente relevantes para fins de desenvolvimento de biofertilizantes, o

que seria uma alternativa aos fertilizantes químicos utilizados em grande escala em todo mundo.

Por outro lado, poucos estudos reportam a ação benéfica de agentes endofíticos em arroz, principalmente quando se trata de estimular o crescimento, ganho de massa ou germinação. No Brasil, estudos que investiguem a ação de procariotos endofíticos, em arroz, seriam de natureza inédita e apresentariam um viés relevante, pois o país se destaca como um dos maiores produtores da cultura, além de ser o maior consumidor das Américas, tendo o cereal como base da alimentação. Diante do exposto, o presente trabalho preconizou selecionar e investigar a atividade de isolados bacterianos endofíticos, autóctones de arroz, quanto à capacidade em promover o crescimento de plântulas e plantas, e estimular o vigor e a germinação de sementes.

### **3.2 Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e Biocontrole do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. As plantas de arroz da cv. GURI INTA CL, foram cultivadas em solo não esterilizado em casa-de-vegetação com temperatura e umidade parcialmente controladas, sendo parte do clima *Cfa* (subtropical úmido), apresentando temperatura média anual de 19,5 °C, sendo a do mês mais quente 24,5 °C e a do mês mais frio, 14,3 °C, com precipitação de 1347,4 mm, distribuída ao longo do ano (Conceição, 1997).

#### **3.2.1 Isolamento das bactérias endofíticas**

As bactérias endofíticas foram isoladas de colmos e raízes de plantas de arroz, coletadas em seis cidades produtoras da cultura no estado do Rio Grande do Sul: Cachoeirinha, Capão do Leão, Eldorado do Sul, Itaqui, Maçambará e Viamão. As amostras para o isolamento das bactérias endofíticas foram obtidas de plantas de arroz sadias e/ou que apresentavam baixa intensidade de ataque de patógenos, coletadas em apenas uma lavoura de cada um dos municípios citados.

As plantas coletadas foram submetidas a uma lavagem superficial, dos colmos e raízes, em água corrente para remoção dos resíduos sólidos. Posteriormente, fragmentos de tecidos de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup> foram

cortados e submetidos à desinfestação superficial em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 1% por um minuto e tripla lavagem com água destilada e esterilizada, conforme metodologia utilizada por Paz *et al.* (2012), com adaptações. Em seguida, os fragmentos foram macerados em água destilada esterilizada, e mantidos em repouso durante um minuto. Do extrato obtido foi realizada uma diluição em série (fator =  $1:10^3$ ), e uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  foi semeada e espalhada em placas de Petri contendo meio sólido 523 de Kado & Heskett (1970). As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h e, após o surgimento das colônias individualizadas, um total de 303 isolados endofíticos foram repicados.

### **3.2.2 Cultivo e preservação das bactérias endofíticas**

As culturas puras e morfologicamente distintas de cada isolado (Berg *et al.*, 2002), foram repicadas e transferidas para tubos de ensaio contendo meio sólido 523, inclinado. Os tubos foram acondicionados em geladeira a 4 °C. Para constituição de uma coleção biológica, os isolados também foram preservados em óleo mineral (Lelliott & Stead, 1987) e mantidos em temperatura ambiente a  $25 \pm 5$  °C .

### **3.2.3 Microbiolização de sementes**

A cultura pura de cada isolado, mantida em crescimento por 24 h a 28 °C, foi suspensa ( $\sim 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) em solução tampão-fosfato (PBS: 0,1 M; pH 7,0). Em seguida, a suspensão de células bacterianas foi adicionada em copos plástico de 50 mL contendo sementes de arroz previamente desinfestadas superficialmente (um minuto em álcool 70%, dois minutos em hipoclorito de sódio 1,5% e três lavagens em água destilada e esterilizada). As sementes em imersão foram mantidas sob agitação constante (Sheker Tecnal, TE 420) a 150 rpm a  $25 \pm 5$  °C, por 24 h.

Paralelamente, as sementes foram imersas nos seguintes tratamentos: água destilada e esterilizada (controle), Solução Tampão-Fosfato (PBS) (0,1 M; pH 7,0), indutor de resistência Acibenzolar-S-metil (ASM; 0,05 g/L) e indutor de resistência GreenForce (5 mL/L).

As sementes, após microbiolizadas, foram pré-germinadas em placas de Petri contendo papel Germitest umedecido em água destilada esterilizada (2,5

vezes o peso do papel), durante 24 h a  $25 \pm 5$  °C em fotoperíodo de 12 h, para assegurar a viabilidade das sementes utilizadas durante o teste.

### 3.2.4 Bioensaio *in vitro*

Os 303 isolados endofíticos foram avaliados quanto à capacidade em inibir o crescimento micelial do fungo desafiante *Bipolaris oryzae*. A metodologia utilizada foi a mesma proposta por López-Bucio *et al.* (2007), com modificações. Sementes foram desinfestadas superficialmente e pré-germinadas por 24 h em papel Germitest umedecido com água destilada esterilizada. Em câmara de fluxo laminar, quatro sementes de arroz pré-germinadas foram transferidas para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo ágar-água (2% p/v), e acomodadas distantes uma da outra, em linha, no centro da placa. Em seguida as placas foram acomodadas em bandejas na posição vertical e, incubadas em câmara de crescimento tipo BOD, a  $25 \pm 5$  °C sob fotoperíodo de 12 h.

Após quatro dias, foi realizada a mensuração do sistema radicular e da parte aérea das plântulas. Além dos isolados, foram utilizados como tratamentos: PBS, ASM, GreenForce, e água (como controle negativo).

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro blocos e quatro repetições para cada tratamento, e os dados obtidos foram analisados no programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011), em que as médias foram submetidas à análise de variância e, quando significativas, comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.2.5 Bioensaio em casa-de-vegetação

As bactérias endofíticas eleitas como promissoras no bioensaio *in vitro*, foram avaliadas quanto à capacidade em promover o crescimento de plantas de arroz em casa-de-vegetação e comparadas com os tratamentos água (controle), PBS, ASM, e GreenForce.

Para tal, sementes de arroz foram desinfestadas superficialmente e microbiolizadas com suspensão ( $\sim 10^8$  células mL<sup>-1</sup>) de cada isolado, por 24 h a  $25 \pm 5$  °C. Em seguida, depositadas em placas de Petri contendo papel de germinação Germitest umedecido, por 24 h a  $25 \pm 5$  °C sob fotoperíodo de 12 h.

Sementes pré-germinadas foram semeadas em copos plásticos de 300 mL, contendo solo não esterilizado (Policultura Rosa) e mantidas em casa-de-

vegetação, com temperatura de  $25 \pm 5$  °C. Os copos ficaram submersos em 1/3 de sua altura sob lâmina d'água, para manter a umidade e as condições peculiares do arroz irrigado. Como controle negativo, utilizou-se apenas sementes não microbiolizadas imersas em água destilada e esterilizada. Após 30 dias, os parâmetros avaliados foram: a) altura da planta mensurada com auxílio de régua, em centímetros (cm); b) número de folhas; c) peso da matéria fresca da raiz; d) peso da matéria fresca da parte aérea; e) peso da matéria seca da raiz; f) peso da matéria seca da parte aérea (Araújo & Guerreiro, 2010 – com adaptações). Para avaliar a matéria seca, as plantas foram secas em estufa a 65 °C durante sete dias. A média de três plantas para os parâmetros peso da matéria fresca e seca da raiz e da parte aérea foi considerada como valor 100 no tratamento controle.

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições por tratamento, considerado como padrão de avaliação de cada parâmetro, três plantas por repetição. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011) e as médias foram submetidas à análise de variância e, quando significativas, comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

### **3.2.6 Teste Padrão de Germinação**

Foram conduzidos testes de vigor (primeira contagem da germinação) e germinação, para caracterização do lote de sementes e para avaliar se os isolados bacterianos apresentavam ou não, potencial para inibir ou estimular a germinação. Antes da montagem do teste, as sementes foram submetidas à desinfestação superficial em álcool 70% (um minuto), hipoclorito de sódio 1,5% (dois minutos) e três lavagens em água destilada esterilizada.

A metodologia utilizada seguiu os padrões recomendados pelas Regras de Análises de Sementes (RAS) (Brasil, 2009). Para o teste de germinação foram utilizadas oito repetições de 50 sementes, distribuídas em papel Germitest umedecido com água destilada esterilizada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. As sementes foram acondicionadas em temperatura de  $25 \pm 5$  °C sob fotoperíodo de 12 h. Aos 14 dias, foi avaliado o total de plântulas normais, seguindo os padrões estabelecidos pela RAS. Os percentuais de plântulas normais de cada repetição foram computados para avaliação da germinação. O vigor foi realizado conjuntamente com o teste de germinação, constituindo do

registro de plântulas normais verificadas na primeira contagem do teste de germinação, realizada aos cinco dias após a semeadura em papel Germitest, conforme os padrões da RAS (Brasil, 2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados com valores expressos em porcentagem foram transformados com a aplicação da fórmula:  $\arcsen(\sqrt{x/100})$ . Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011) e as médias foram submetidas à análise de variância e, quando significativas, comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

### **3.2.7 Identificação das bactérias: extração do DNA e amplificação do fragmento gênico 16S rDNA**

Para extração do DNA genômico empregou-se o protocolo experimental de Woo *et al.* (1992). Para tanto, as colônias bacterianas, selecionadas como mais eficientes em casa-de-vegetação, foram cultivadas em 5 mL de meio líquido 523 sob agitação (150 rpm) a 28°C. Após 24 h de incubação, foi transferido 1 mL de cultura bacteriana de cada isolado para microtubos (Eppendorf™microcentrifuge, mod. 5415C) e centrifugado a 13.000 rpm por um minuto à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e dissolvido cuidadosamente o precipitado em 1 mL de tampão TNE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, NaCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA pH 8 10 mM). A suspensão de células bacterianas foi novamente concentrada através de centrifugação a 13.000 rpm, durante 1 minuto à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido vagarosamente em 135 µL do tampão TNE. Em seguida foram adicionados 135 µL de TNE com 2% de Triton X-100 e 30 µL de lisozima (5 mg/mL). A solução foi misturada suavemente e incubados em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. Após a primeira incubação, 15 µL de proteinase K (20 mg/mL) foi misturada por inversão e os microtubos foram incubados novamente em banho-maria a 65°C durante 2 h.

Por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi procedida a amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos. A PCR foi composta de tampão 1X (Invitrogen), contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 50 mM de KCl; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA, sendo o volume final ajustado com água ultrapura para 20 µL. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nessa reação foram 27F

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG e 1525R AAGGAGGTGWTCCARCC, retirados do estudo de Palumbo *et al.* (2007). A reação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 55 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 90 s, seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 min (Palumbo *et al.*, 2007). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado pela comparação com o perfil eletroforético do marcador de massa molecular de 1 Kb (Promega) em gel de agarose a 1% em TBE 1X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2 mM de EDTA]. Adicionalmente, foi realizada a estimativa da concentração dos fragmentos amplificados. Para tanto, foram aplicados no gel, 500 ng do marcador  $\lambda$ HindIII. O gel foi deixado em contato com uma solução de tampão TBE 1X adicionada de brometo de etídio (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) por 10 min. Em seguida, o gel foi exposto a luz UV e fotografado. Por fim, os fragmentos amplificados a partir do DNA de cada bactéria foram submetidos ao sequenciamento. Esse último procedimento está sendo realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

### 3.3 Resultados

Dos 303 isolados obtidos, 138 são provenientes da raiz e 165 do colmo. No bioensaio *in vitro*, que visou avaliar a capacidade de cada bactéria em promover o comprimento de raiz e alongação da parte aérea, 35 isolados (11,5% do total) foram eficientes em aumentar o comprimento da raiz (Figura 1) e sete (2,3% do total) em promover a alongação da parte aérea (Figura 2), quando comparados com o controle (água). Destes, o isolado 251, embora não tenha diferido estatisticamente dos demais isolados, apresentou aumento no comprimento da raiz de 3,75 cm quando comparado com o controle. Já o tratamento com o isolado 193 teve um acréscimo de 3,1 cm na alongação da parte aérea, comparativamente com o controle.

Os isolados 209, 21 e 308 foram os melhores isolados para os dois parâmetros avaliados, com capacidade para estimular o crescimento da parte aérea, bem como promover a alongação da raiz principal, *in vitro* (Figura 3). Como exemplo, a Figura 4 mostra a atividade promotora do isolado 209 em

comparação com a água, ASM, GreenForce, PBS e o isolado 319 que apresentou crescimento reduzido tanto da raiz quanto da parte aérea.

Os tratamentos com PBS e ASM, embora tenham apresentado pouco incremento, diferiram estatisticamente do controle, com aumentos de 1,09 e 1,58 cm do comprimento da raiz principal, respectivamente (Figura 1). Já o tratamento com GreenForce apresentou redução de 2,38 cm da raiz, comparativamente com a água. Para o crescimento da parte aérea, os tratamentos com PBS, ASM e GreenForce não diferiram estatisticamente do controle (Figura 2).

Em casa-de-vegetação, foram testados os isolados eleitos como os melhores em promover o crescimento da raiz e/ou parte aérea, durante o teste *in vitro*. Dessa forma, quatro isolados (isolados 52, 49, 282 e 193) foram promissores em promover o aumento da altura das plantas em até 12,48 cm, promovido pelo isolado 52, número de folhas (isolados 52, 49, 282 e 193) e peso da massa fresca da raiz (isolados 282, 267, 294, e 277) em que o isolado 282 promoveu incrementos de 202,5% (Tabela 1). O isolado 52 se destacou como eficiente em aumentar o peso da massa fresca da parte aérea em 342,8% comparativamente com o tratamento controle (água) (Tabela 1).

Observando-se a Tabela 1, para o peso da massa seca da parte aérea, quatro isolados (52, 49, 282 e 193), mais o tratamento com ASM, foram promissores em promover incrementos substanciais de 100, 200, 220, 190 e 170%, respectivamente, em comparação com a água. O peso da massa seca da raiz foi aumentado por sete isolados (52, 282, 193, 277, 160, 294 e 274) mais o tratamento com ASM, conforme apresentado na (Tabela 1).

Com os nove isolados que obtiveram os melhores resultados em casa-de-vegetação, foi realizado o Teste Padrão de Germinação (Tabela 2). Os isolados 49, 52 e 277, embora não tenham diferido estatisticamente do controle, apresentaram índices de vigor de 69, 68,5 e 68%, respectivamente. Os isolados 277, 193, 282, 294, 274 e 52, apresentaram índices de germinação de 74,5%, 74%, 73,5%, 72,5%, 72,5% e 72%, respectivamente, embora não apresentem diferença estatística quando comparados com o controle. Quando tratadas com GreenForce, PBS e isolados 193, 274 e 160, o vigor das sementes foi afetado. Além disso, o tratamento com PBS e isolado 160 também afetou negativamente a germinação das sementes.

Com relação à identificação dos isolados promissores, o procedimento de sequenciamento encontra-se em andamento pela ACTGene Análises Moleculares Ltda.

### 3.4 Discussão

Foi demonstrado neste estudo que bactérias endofíticas podem interferir positivamente no desenvolvimento de plantas de arroz, como fitoestimuladoras do crescimento vegetal, tal qual reportado para outras culturas em diversos trabalhos (Ting *et al.*, 2008; Jasim *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2014; Rangjaroen *et al.*, 2014). No bioensaio *in vitro*, 35 isolados atuaram positivamente em estimular o comprimento da raiz e sete em aumentar a altura das plântulas. Estudos demonstram que as bactérias endofíticas podem promover o crescimento da planta através da produção de fitormônios e sideróforos, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, ou a atividade enzimática, tal como a supressão de etileno por ácido aminociclopropano-1-carboxílico desaminase (Berg & Hallmann, 2006), bem como fornecer vitaminas essenciais para as plantas (Pirttila *et al.*, 2004). Curiosamente, alguns isolados, restringiram ou suprimiram o crescimento de plântulas (dados não mostrados). Isso, provavelmente, está relacionado à síntese de substâncias inibidoras, que ainda precisam ser investigadas nesse estudo. Estudos realizados por Kang *et al.* (2007) demonstraram haver a redução da germinação de sementes de cevada e trigo pela substância fenazina, sintetizada por *Pseudomonas chlororaphis* O6. Adicionalmente, os autores relatam a ação indutora de resistência da substância em plantas de tabaco contra a fitobactéria *Pectobacterium carotovorum*.

O ácido cianídrico (HCN) é outra substância sintetizada por bactérias benéficas que podem restringir o crescimento radicular ou até mesmo o crescimento da planta por apresentar efeito fitotóxico (Bakker & Schippers, 1987; Schippers *et al.*, 1990; Kremer & Souissi, 2001; Gurley & Zdor, 2005). Outros estudos também reportam a atividade inibitória ou de restrição do ácido indol-3-acético (AIA) em sementes e plântulas, quando produzido em altas concentrações por bactérias (Arshad & Frankenberger, 1991). Esses fenômenos ocorrem em decorrência do AIA microbiano modificar a auxina endógena da planta para um nível ótimo ou acima dele (Sarwar & Kremer, 1995; Patten & Glick, 1996; Araujo & Guerreiro, 2010). No tocante ao estímulo positivo para o crescimento, bactérias

podem sintetizar giberelinas (Holl *et al.*, 1988), ácidos lático e succínico (Yoshikawa, 1993), bem como a produção de AIA (Boronin *et al.*, 1993; Glick, 2012) *in vitro*, promovendo o aumento da plântula e da raiz. Notadamente, os 35 isolados que estimularam o crescimento da raiz e os sete isolados que estimularam o aumento da parte aérea, possivelmente podem ter produzido algumas dessas substâncias, possibilitando o aumento ou regulação positiva dos fitormônios endógenos. Isso porque mecanismos envolvidos na solubilização ou otimização da absorção de nutrientes, não foram possibilitadas, visto que o meio de cultura ágar-água, não apresenta nutrientes.

Os isolados 209, 21 e 308 se destacaram por promover o crescimento tanto da raiz quanto da parte aérea. Esse fenômeno pode estar relacionado com a síntese de giberelina que geralmente estimula o crescimento da parte aérea, e auxina, que estimula o crescimento da raiz (Glick, 1995; Bottini *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2014). Araujo *et al.* (2005) trabalhando com um isolado de *Bacillus subtilis* constataram a síntese de AIA e Ácido Indol Butírico (AIB) pela bactéria em resposta a exsudatos de raiz de soja, o que proporcionou aumentos significativos no sistema radicular das plantas. Kang *et al.* (2014) constataram o aumento substancial da parte aérea, da massa fresca e clorofila, de plantas de arroz, estimulados pela síntese de giberelina pela bactéria *Leifsonia soli* SE134. Zamioudis *et al.* (2013), testaram a atividade promotora de crescimento de três bactérias de mudas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia, em meio Murashige e Skoog (MS), mostrando que todas as bactérias foram capazes de estimular a produção de biomassa vegetal, ocorrendo acréscimos de até 3,9 vezes na produção de massa fresca das mudas.

No ensaio *in vitro*, os tratamentos com PBS e ASM, embora tenham diferido estatisticamente do controle, apresentaram tamanho de raiz e parte aérea consideravelmente inferior aos tratamentos com os isolados endofíticos. Isso pode ter ocorrido porque o ASM como indutor de resistência, pode estimular as respostas de defesa da plântula, gerando um custo energético e restringindo a germinação e crescimento das mesmas. O resultado apresentado pelo PBS já era esperado, pois se trata de uma solução tampão e foi usado como cautela adicional em nossos experimentos haja vista que foi utilizado no preparo da suspensão das células bacterianas para microbiolização das sementes. O pequeno acréscimo no comprimento da raiz proporcionado por esse tratamento

pode ter sido decorrente da presença de fósforo em sua composição, que é um macronutriente essencial ao desenvolvimento das plantas. Já o tratamento com GreenForce reduziu drasticamente o comprimento da raiz e da parte aérea, comparativamente com a água, possivelmente por ser um produto a base de extrato de café que talvez contenha substâncias com ação inibitória à germinação e ao desenvolvimento das plântulas de arroz, e também por esse produto ser um indutor de resistência, que pode ter estimulado respostas de defesa da planta, gerando gastos energéticos para a mesma.

Em casa-de-vegetação, nove isolados se destacaram como bons promotores de crescimento em plantas de arroz. Mas, curiosamente, os isolados 209, 21 e 308 não apresentaram resultados satisfatórios em promover o crescimento nessas condições (dados não mostrados). Este fato pode estar relacionado com a incapacidade desses isolados em competir eficientemente com a microbiota natural do solo, assim, sucumbindo rapidamente à introdução. De maneira geral, os isolados 52, 49, 282 e 193 se destacaram como promissores em condições de casa-de-vegetação (Tabela 1) por proporcionar acréscimos significativos ao crescimento das plantas. Estes resistiram à introdução e desencadearam mecanismos que potencializaram a absorção de nutrientes e/ou síntese de fitormônios. De forma semelhante, Kandasamy *et al.* (2009) demonstraram que sementes de arroz expostas a suspensões bacterianas de rizobactérias estimularam o crescimento das plantas em comparação com as sementes não tratadas, obtendo aumento no comprimento médio das raízes (25,30 centímetros) e da parte aérea (11,88 centímetros), além de apresentar maior peso da massa fresca e seca de mudas (1.025,2 mg e 806,4 mg, respectivamente) quando tratadas com *Pseudomonas fluorescens* KH-1. Teixeira *et al.* (2001) conseguiram resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo. Esses autores, testando rizobactérias isoladas de rizosfera de eucalipto, observaram que estacas enraizadas em substrato tratado com antagonistas apresentavam aumento de até 110% de ganhos no enraizamento médio, e até 250% no peso da raiz. Além disso, as mesmas rizobactérias reduziram significativamente a intensidade de ferrugem, *Puccinia psidii*, em estacas.

Os resultados desse estudo também estão de acordo com os obtidos por Moura (1996), em um estudo com actinomicetos selecionados para o biocontrole da murcha bacteriana das solanáceas, causada por *Ralstonia solanacearum*. A

autora verificou que, além de proporcionar o controle da doença, as sementes microbiolizadas com os isolados, originaram plantas com aumento da área foliar, do peso da matéria seca, da altura e do número de folhas. Em outro estudo, Ji *et al.* (2014) trataram sementes de arroz com bactérias endofíticas diazotróficas e observaram o aumento em altura das plantas e maior peso seco, além de efeitos antagonísticos contra fungos patogênicos. Os autores também estudaram possíveis mecanismos de promoção de crescimento vegetal. Dentre os 12 isolados testados, 10 demonstraram maior atividade à produção de auxina, seis isolados apresentaram alta atividade na produção de sideróforos e quatro isolados tiveram alta atividade de solubilização de fosfato.

Ashrafuzzaman *et al.* (2009) também avaliaram a promoção de crescimento em plantas de arroz por 10 rizobactérias, e constataram aumento significativo da altura, comprimento de raiz e peso da matéria seca da parte aérea e da raiz. Alguns isolados apresentaram síntese de AIA e solubilização do fósforo. Paz *et al.* (2012) verificaram que o isolado endofítico EUCEB 13 apresentou aumento do comprimento da parte aérea de eucalipto, porém a maior atividade ocorreu no sistema radicular, promovendo um aumento significativo de 24,8% no comprimento da raiz principal.

Os dados obtidos no TPG revelaram que não houve diferença estatística entre os isolados que promoveram os maiores índices de vigor e germinação e o tratamento controle (Tabela 2). Alguns isolados obtiveram desempenhos insatisfatórios frente aos parâmetros avaliados, apresentando índices de vigor e germinação inferiores ao controle. Os isolados 193, 274, 160 e os tratamentos com GreenForce e PBS reduziram significativamente o vigor das sementes, enquanto o isolado 160 e o tratamento com PBS reduziram a germinação. Da mesma forma que ocorreu no teste *in vitro*, isso também pode ter acontecido devido à síntese de substâncias inibidoras ou por mecanismos de indução de resistência desencadeados pelos isolados endofíticos, não investigados neste estudo. Kang *et al.* (2007) demonstram claramente esses fenômenos em seu estudo, como referido anteriormente. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Vrbničanin *et al.* (2011), em que avaliaram o efeito da germinação de sementes de *Ambrosia artemisiifolia* L. por rizobactérias, onde ocorreu a redução da germinação nos tratamentos com *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus licheniformis*, porém os mecanismos que afetam a germinação não foram

discutidos por esses autores. Paz *et al.* (2007) encontraram resultados semelhantes em seu estudo com sementes de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), tratadas com endofíticos, com inibição de 22,79% na germinação de milho e 14,29% na germinação de feijão, quando comparadas com o tratamento controle. Esses autores relatam que inibição da germinação pode ter ocorrido devido a fatores como o efeito inibitório ocasionado por um inóculo elevado, acarretando em um efeito de competição por nutrientes entre o micro-organismo e o embrião vegetal, podendo também ter ocorrido a produção de metabolitos tóxicos pela bactéria à semente, o que contribuiu para a redução nos índices de crescimento das radículas ou até mesmo a morte do embrião.

### **3.5 Conclusões**

Pode-se concluir que dos isolados testados, 11,5% foram eficientes em promover o crescimento de raízes e 2,3%, promissores no desenvolvimento da parte aérea, *in vitro*. Em casa-de-vegetação, nove isolados se descaram como potenciais promotores de crescimento das plantas, e o teste de vigor e germinação de sementes não apresentaram diferença estatística quando comparados ao tratamento controle.

### **Agradecimentos**

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto desenvolvido e ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal e Biocontrole do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo suporte na execução dos experimentos.

### 3.6 Referências Bibliográficas

Araujo F F, & Guerreiro R T (2010) Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia** 34:837-844.

Araujo F F, Henning A, Hungria M (2005) Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 21:1639-1645.

Arshad M, & Frankenberger W T (1991) Microbial production of plant hormones. **Plant Soil** 133:1-8.

Ashrafuzzaman M, Hossen F A, Ismail M R, Hoque M A, Islam M Z, Shahidullah S M, Meon S (2009) Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **African Journal of Biotechnology** 8:1247-1252.

Babalola O O (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology letters** 32:1559-1570.

Bakker A W, & Schippers B (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growthstimulation. **Soil Biology & Biochemistry**. 19:451-457.

Berg G, Roskot N, Steidle A, Eberl L, Zock, A, Smalla, K (2002) Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied and Environmental Microbiology** 68:3328-3338.

Berg G, & Hallmann J (2006) Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: **Microbial Root Endophytes** (Schulz B, Boyle C and Sieber TN, eds.). Springer-Verlag, Berlin, 53-66.

Boronin A M, Kochetkov V V, Dubeikovskiy A N, Mordukhova E A (1993) Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. In: **VI International Congress of Plant Pathology**, Montreal, Canada, International Society of plant pathology, p. 276.

Bottini R, Cassán F, Piccoli P (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology** 65: 497–503.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009) **Regras para análise de sementes**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p.

Conceição C L (1997) Ondas de calor e temperatura sensível em Porto Alegre (RS). Monografia (Graduação em Geografia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Costa P B (2012) **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal em lavouras experimentais de arroz sob diferentes níveis de fertilização**. Porto Alegre – Rio Grande do Sul: UFRGS, 50p. (Dissertação de mestrado).

Ferreira D F (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1039-1042.

Gurley H G, & Zdor R E (2005) Differential rhizosphere establishment and cyanide production by alginate-formulated weed-deleterious rhizobacteria. **Current Microbiology** 50:167-171.

Glick B R (1995) The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. **Canadian Journal of Microbiology** 41:109-117.

Glick B R (2012) Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* 2012:1-15.

Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology** 60:579-598.

Hidayati U, Chaniago I A, Munif A, Siswanto, Santosa D A (2014) Potency of plant growth promoting endophytic bacteria from rubber plants (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). **Journal of Agronomy** 13:147-152.

Holl F B, Chanway C P, Turkington R, Radley R A (1988) Response of crested wheatgrass (*Agropyron crystatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry** 20:19-24.

James E K, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio W L, Reddy P M, Iannetta P P, Olivares F L, Ladha J K (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant Microbe Interactions** 15:894 –906.

Jasim B, Joseph A A, John C J, Mathew J, Radhakrishnan E K (2014) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. **3 Biotech** 4:197–204.

Jesus J A (2013) Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas. Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 107p. (Dissertação de mestrado).

Ji S H, Gururani M A, Chun S C (2014) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research** 169:83– 98.

Jones K M, Kobayashi H, Davies B W, Taga M E, Walker G C (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model. **Nature Reviews Microbiology** 5: 619-633.

Kandasamy S, Loganathan K, Muthuraj R, Duraisamy S, Seetharaman S, Thiruvengadam R, Ponnusamy B, Ramasamy S (2009) Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. **Proteome Science** 7:47.

Kado C I, Heskett M G (1970) Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969.

Kang B R, Han S H, Zdor R E, Anderson A J, Spencer M, Yang K Y, Kim Y H, Lee M C, Cho B H, Kim Y C (2007) Inhibition of seed germination and induction of systemic disease resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6 requires phenazine production regulated by the global regulator, GacS. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 17:586–593.

Kang S M, Khan A L, You Y H, Kim J G, Kamran M, Lee I J (2014) Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 24:106–112.

Kremer R J, & Souissi T (2001) Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. **Current Microbiology** 43:182-186.

Kuss A V (2006) **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Santa Maria - RS, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 109p.

Lelliott R A A, & Stead D E (1987) **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease** 216.

López-Bucio J, Campos-Cuevas J C, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Farías-Rodríguez R, Macías-Rodríguez L I, Valencia-Cantero E (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant –Microbe Interactions** 20: 207-217.

Moura A (1996) **Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa. 1996. 64p.

Mucciarelli M, Scannerini S, Berteà C, Maffei M (2003) *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist** 158:579-591.

Palumbo J D, O’Keeffe T L, Abbas H K, (2007) Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Journal of Food Protection** 70:1615-1621.

Patten C L, & Glick B R (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology** 42:207-220.

Paz I C P, Santin R C M, Guimarães A M, Rosa O P P, Dias A C F, Quecine M C, Azevedo J L, Matsumura A T S (2012) Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and Molecular Research** 11:3711-3720.

Paz I C P, Cagliari M R, Biazin A G, Silva-Ribeiro R T, Azevedo J L (2007) Efeito inibitório na germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mays*) microbiolizadas com um isolado endofítico de *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Agroecologia** 2: 717-720.

Pirttila A, Joensuu P, Pospiech H, Jalonen J, Hohtola A (2004) Bud endophytes of scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. **Physiologia Plantarum** 121:305–312.

Quecine M C, Araújo W L, Rossetto P B, Ferreira A, Tsui S, Lacava P T, Mondin M, Azevedo J L, Pizzirani-Kleiner A A (2012) Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology** 78:7511–7518.

Rangjaroen C, Rerkasem B, Teaumroong N, Noisangiam R, Lumyong S (2014) Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces. *Annals of Microbiology* 64:1-14.

Sarwar M, & Kremer R J (1995) Enhanced suppression of plant growth through production of Ltryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant Soil** 172:261-269.

Silva H S A, Tozzi J P L, Terrasan C R F, Bettiol W (2012) Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control** 63:62–67.

Schippers B, Bakker A W, Bakker P, van Peer R (1990) Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interaction. **Plant Soil** 129:75-83.

Shishido M, Breuil C, Chanway C P (1999) Endophytic colonization of spruce by growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology** 29:191–196.

Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Zahid M, Zafar M (2014) Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 30:719–725.

Teixeira D A, Alfenas A C, Zauza E A V, Maffia L A, ROMEIRO R S (2001) Promoção de enraizamento e indução de resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* por rizobactérias – INPI 0214. **Fitopatologia Brasileira** 26:304.

Ting A S Y, Meon S, Kadir J, Radu S, Singh G (2008) Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl** 53:541–553.

- Varma A, Verma S, Sudah S N, Franken P (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growthpromoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology** 65:2741-2744.
- Vrbničanin S, Božić D, Sarić M, Pavlović D, Raičević V (2011) Effect of plant growth promoting rhizobacteria on *Ambrosia artemisiifolia* L. seed germination. **Pesticides and Phytomedicine** 26:141–146.
- Woo T H S, Cheng A F, Ling J M, (1992) An application of a simple method for the preparation of bacterial DNA. **BioTechniques** 13:696-698.
- Yoshikawa M (1993) Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology** 39:1150-1154.
- Yuan C L, Mou C X, Wu W L, Guo Y B (2010) Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. **Journal of Soils and Sediments** 11:322-329.
- Zamioudis C, Mastranesti P, Dhonukshe P, Blilou I, Pieterse C M J (2013) Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology** 162:304–318.

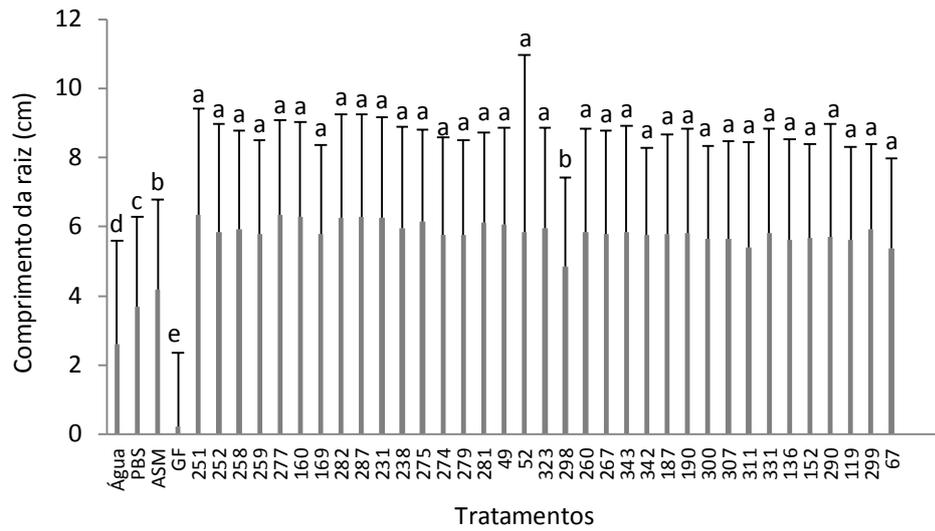


FIGURA 1. Comprimento da raiz principal de plântulas de arroz, originadas de sementes microbiolizadas com bactérias endófitas, Controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM) e GreenForce (GF). As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

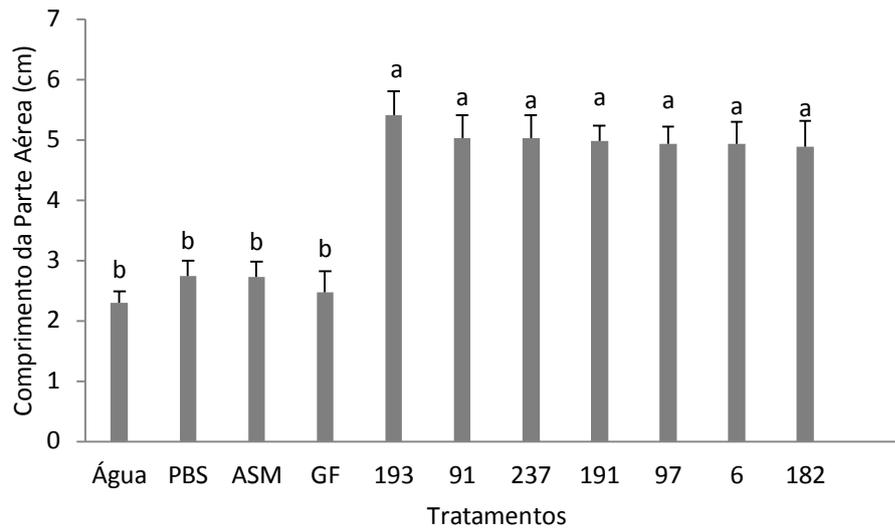


FIGURA 2. Comprimento da parte aérea de plântulas de arroz, originadas de sementes microbiolizadas com bactérias endofíticas, Controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM) e GreenForce (GF). As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

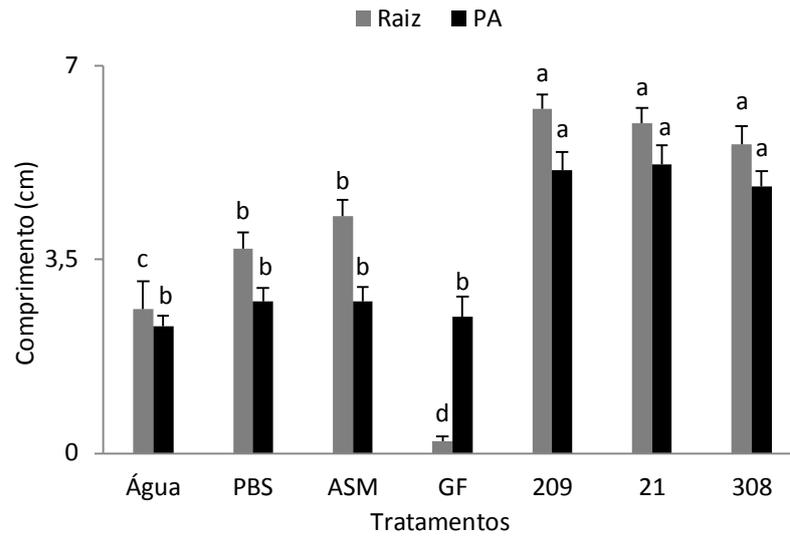


FIGURA 3. Isolados mais eficientes para o crescimento de raiz e de parte aérea de arroz, e tratamentos controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM) e GreenForce (GF). As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

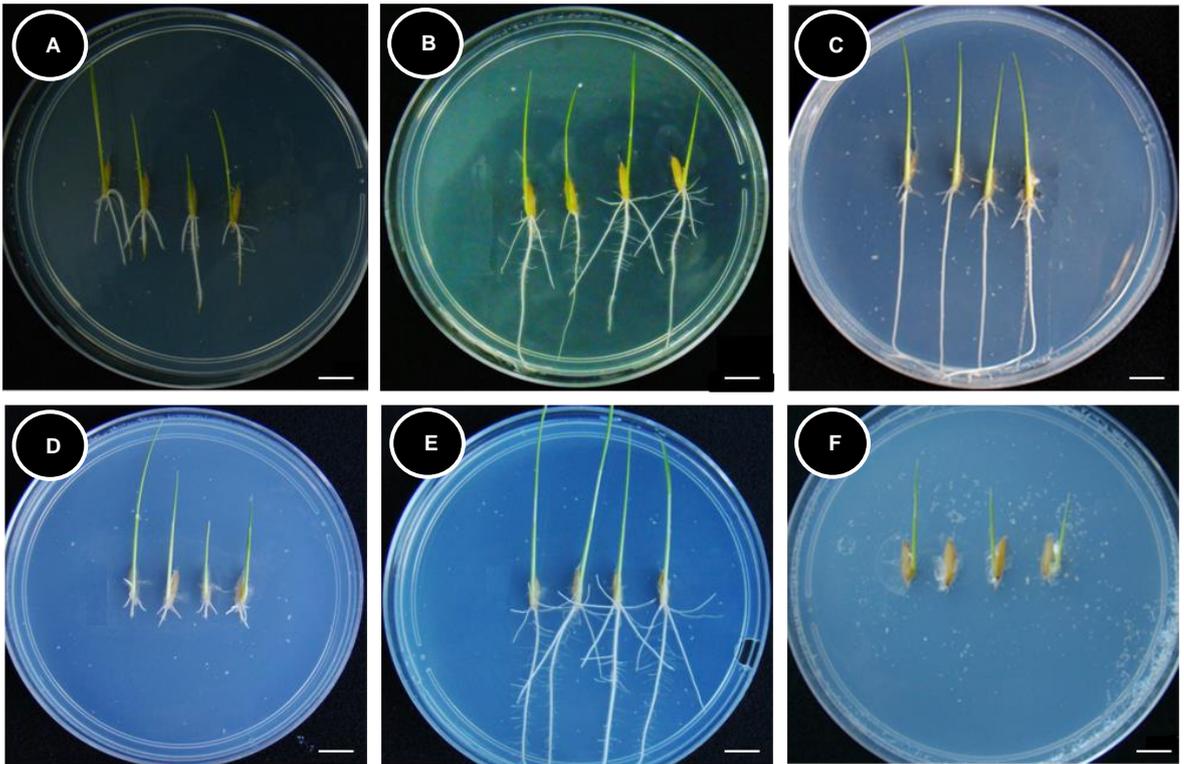


FIGURA 4. Crescimento do sistema radicular e parte aérea, após 4 dias de exposição das sementes aos seguintes tratamentos: A – Controle (água), B - Solução Tampão-Fosfato (PBS) (0,1 M), C – Acibenzolar-S-metil (ASM), D – GreenForce, E – 209, F - 319. (Barras = 1 cm).

TABELA 1. Altura de plantas, número de folhas, massa fresca da parte aérea e raiz, massa seca da parte aérea e raiz, quando comparadas com os tratamentos controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM), e GreenForce.

Tratamentos	Altura (cm)	Nº de folhas	MF Parte aérea (g)	MF Raiz (g)	MS Parte Aérea (g)	MS Raiz (g)
52	41.73 a*	4.55 a*	1.20 a*	0.51 b*	0.23 a*	0.15 a
49	39.40 a	4.65 a	0.89 b	0.25 d	0.20 a	0.12 b
282	38.95 a	4.60 a	0.95 b	0.79 a	0.22 a	0.14 a
193	38.55 a	4.63 a	0.84 b	0.52 b	0.19 a	0.14 a
ASM	34.35 b	3.61 b	0.75 b	0.56 b	0.17 a	0.15 a
267	31.20 c	3.23 b	0.52 c	0.68 a	0.10 b	0.13 b
277	30.75 c	3.00 b	0.41 c	0.63 a	0.08 b	0.15 a
Água	29.25 c	3.08 b	0.35 c	0.39 c	0.10 b	0.10 b
PBS	29.09 c	3.08 b	0.34 c	0.47 c	0.08 b	0.11 b
GreenForce	28.99 c	3.21 b	0.44 c	0.53 b	0.10 b	0.11 b
160	26.33 d	3.18 b	0.39 c	0.58 b	0.08 b	0.18 a
294	24.93 d	3.08 b	0.36 c	0.65 a	0.076 b	0.17 a
274	24.25 d	3.08 b	0.34 c	0.54 b	0.09 b	0.17 a
CV (%)	6.37	10.00	21.99	22.13	24.24	34.67

\*Médias com as mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

TABELA 2. Vigor (%) e germinação (%) de sementes de arroz em resposta à microbiolização de sementes com bactérias endofíticas autóctones de arroz.

<b>Tratamentos</b>	<b>Vigor (%)</b>	<b>Germinação (%)</b>
49	69,00 a*	70,00 a*
52	68,50 a	72,25 a
277	68,00 a	74,50 a
Água	68,00 a	71,50 a
267	67,25 a	68,25 a
282	66,75 a	73,50 a
294	64,00 a	72,50 a
ASM	63,00 a	67,00 a
GreenForce	57,12 b	65,75 a
PBS	55,87 b	59,62 b
193	55,25 b	74,00 a
274	53,25 b	72,50 a
160	44,25 b	51,50 b
CV (%)	13.02	10.89

\*Médias com as mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## **4 SEGUNDO ARTIGO**

### **Bactérias endofíticas de arroz como agentes de biocontrole da mancha- parda**

Preparado de acordo com normas de Australasian Plant Pathology (Versão preliminar)

Bruna Canabarro Pozzebon<sup>1</sup>, Roberto Lanna Filho<sup>1</sup>, Angel Rafaela Stopilha<sup>1</sup>,  
Priscila Silveira Saraiva<sup>1</sup>, Sara Hartke<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor para correspondência: Bruna Canabarro Pozzebon, e-mail:  
bcpozzebon@gmail.com

## Resumo

A mancha-parda do arroz, causada pelo fungo fitopatogênico *Bipolaris oryzae*, é uma das principais doenças da cultura, estando presente em todas as áreas cultivadas. Diante disso, objetivou-se com esse estudo, investigar o potencial de biocontrole de 303 isolados de bactérias endofíticas, contra o fungo fitopatogênico *B. oryzae*, em condições laboratoriais e de casa-de-vegetação. No ensaio *in vitro*, verificou-se a capacidade dos isolados em inibir o crescimento micelial do patógeno, pelo teste de antibiose. Já em casa-de-vegetação, plantas provenientes de sementes microbiolizadas com os isolados, foram avaliadas quanto à capacidade de reduzir a severidade da mancha-parda em folhas. Os resultados mostraram que 25 isolados de bactérias endofíticas foram eficientes na inibição do crescimento micelial do patógeno, dos quais, os isolados 191 e 164 diferiram dos demais, apresentando halos de inibição de 3,5 e 3,18 cm, respectivamente. Em casa-de-vegetação, 39 isolados reduziram a severidade da doença. Isso demonstra que as bactérias endofíticas apresentaram potencial para o biocontrole da doença, podendo ser usadas em estudos futuros para o desenvolvimento de um bioformulado.

**Palavras-chave:** *Bipolaris oryzae*, antibiose, crescimento micelial, severidade.

## 4.1 Introdução

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, [teleomorfo = *Cochliobolus miyabeanus* (Ito and Kuribayashi) Drechs. ex Dastur.], agente etiológico da mancha-parda em arroz, tem se destacado nos últimos anos como uma das principais doenças da cultura, estando presente em praticamente todas as áreas produtoras de arroz e afetando milhões de hectares em todo o mundo a cada safra (Ou 1985; Savary *et al.*, 2000; Barnwal *et al.*, 2013).

O Brasil é o maior produtor de arroz das Américas e tem a mancha-parda como doença economicamente importante, pois ela ocasiona grandes perdas, tanto em rendimento quanto na qualidade dos grãos produzidos nas lavouras brasileiras (Prabhu *et al.*, 2006; Celmer *et al.*, 2007). Os maiores danos podem ocorrer de três maneiras: i) durante a germinação das sementes, resultando em morte das plântulas e redução do estande inicial (Ribeiro, 1988; Bedendo & Prabhu, 2005), ii) em plantas adultas causando manchas necróticas nas folhas, desencadeando o aumento da esterilidade das flores (Ou, 1985) e, iii) na redução do número de grãos por panícula, originando grãos menores e manchados (Lee, 1992). Além disso, a doença pode causar perdas que chegam a 90% no rendimento dos grãos (Sunder *et al.*, 2014). Ba & Sangchote (2006) em seus experimentos visando avaliar a intensidade dessa doença em arroz, encontraram 26% de incidência na fase de maturação de grãos e 1,6% de severidade nas folhas infectadas.

O controle da doença baseia-se principalmente no plantio de cultivares resistentes e/ou pulverizações com fungicidas (Prabhu & Filippi, 2001). No entanto, essas medidas de controle têm se tornado ineficientes, porque o patógeno tem suplantado a resistência das cultivares empregadas, e o uso contínuo de fungicidas, tem aumentado a frequência de patótipos resistentes (Silva & Coelho, 2003; Santos *et al.*, 2006; Sartorato, 2006; Celmer *et al.*, 2007).

Dessa forma, o biocontrole proporcionado por bactérias endofíticas pode ser uma alternativa de manejo eficiente em reduzir ou eliminar o uso abusivo de fungicidas. Micro-organismos habitantes dos tecidos internos de diversas espécies de plantas (Strobel *et al.*, 2004), as bactérias endofíticas podem prevenir ou reduzir efeitos deletérios causados por patógenos a partir de múltiplos mecanismos de ação, desempenhados pela síntese de sideróforos, compostos voláteis, substâncias antimicrobianas, competição por espaço e nutrientes,

resistência sistêmica (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Compant *et al.*, 2010; Lanna Filho, 2011) e outros.

A interação de bactérias endofíticas associadas a plantas tem sido objeto de estudo em todo mundo (Sun *et al.*, 2008) e podem apresentar vantagens adicionais em relação a outros agentes de biocontrole por colonizarem sistêmica ou parcialmente a planta. Adicionalmente, os endofíticos, por natureza, vivem em locais particularmente protegidos da competição microbiana, caso não observado no ambiente do solo (Sturz *et al.*, 2000; Whipps, 2001). Compant *et al.* (2005) demonstraram que a *Burkholderia* sp. PsJN foi capaz de colonizar eficientemente toda uma planta de videira, provando que esse organismo é capaz de se movimentar pelos vasos e ocupar diferentes nichos. No tocante ao controle de doenças, há inúmeros estudos reportando o sucesso do uso de bactérias endofíticas (Barretti *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013; Purnawati *et al.*, 2014). Silva *et al.* (2008), mostraram que o isolado endofítico 119G reduziu significativamente a severidade da ferrugem do cafeeiro em níveis de controle acima de 60% em mudas previamente tratadas com essa bactéria. Da mesma forma, Nawangsih *et al.* (2011), estudaram dois isolados de bactérias endofíticas para biocontrole da murcha bacteriana do tomateiro, em que os isolados BC4 e BL10 reduziram significativamente a intensidade da doença em 33% e 43%, respectivamente.

Embora sejam realizados estudos com bactérias endofíticas em diferentes culturas, há uma carência de trabalhos com esses micro-organismos em associação com plantas de arroz. Mano & Morisaki (2008) relatam estudos realizados com bactérias endofíticas em arroz, mas citam poucos trabalhos relacionados ao biocontrole de patógenos da cultura. Notadamente, se faz necessária a busca e investigação por bactérias endofíticas que controlem eficientemente as principais doenças que acometem a orizicultura. Neste contexto, este estudo teve a finalidade de avaliar o potencial de biocontrole de isolados de bactérias endofíticas, autóctones de arroz, contra o fungo fitopatogênico *B. oryzae*, em condições laboratoriais e de casa-de-vegetação.

## **4.2 Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e Biocontrole do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, Brasil. As plantas de arroz da cv. GURI

INTA CL, foram cultivadas em solo não esterilizado em casa-de-vegetação com temperatura e umidade parcialmente controladas, sendo parte do clima *Cfa* (subtropical úmido), apresentando temperatura média anual de 19,5 °C, sendo a do mês mais quente 24,5 °C e a do mês mais frio, 14,3 °C, com precipitação de 1347,4 mm, distribuída ao longo do ano (Conceição, 1997).

#### **4.2.1 Isolamento das bactérias endofíticas**

As bactérias endofíticas foram isoladas de colmos e raízes de plantas de arroz sadias e/ou com baixa intensidade de doenças. Essas plantas foram coletadas em seis cidades produtoras da cultura no estado do Rio Grande do Sul: Cachoeirinha, Capão do Leão, Eldorado do Sul, Itaqui, Maçambará e Viamão. As amostras de plantas foram coletadas em uma lavoura apenas, de cada um dos municípios citados. A metodologia utilizada para isolamento das endofíticas foi a mesma proposta por Paz *et al.* (2012), com adaptações, na qual colmos e raízes foram submetidos à lavagem superficial com água corrente para remoção do excesso de impurezas e, em seguida, fragmentos de tecidos foram cortados em aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup> e submetidos à desinfestação superficial em álcool 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio a 1% (um minuto) e uma tripla lavagem em água destilada esterilizada.

Após desinfestação, raízes e colmos foram macerados individualmente em água destilada esterilizada, e mantidos em repouso por 30 segundos. Do extrato obtido, uma diluição seriada (fator = 1:10<sup>3</sup>) foi realizada e uma alíquota de 50 µL foi semeada em placas de Petri sobre meio sólido 523 de Kado & Heskett (1970). As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h. Colônias individualizadas e morfologicamente distintas que surgiram nas placas foram repicadas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio. Foram isoladas 303 bactérias endofíticas.

#### **4.2.2 Cultivo e preservação dos micro-organismos**

Os isolados obtidos foram preservados em tubos de ensaio com meio 523 inclinado (Romeiro, 2001), para o uso contínuo, e em óleo mineral (Lelliott & Stead, 1987), para estoque e preservação das características genéticas (Romeiro, 2001). O fitopatógeno *B. oryzae* foi adquirido da coleção de fitopatógenos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Departamento de Fitossanidade, da Universidade Federal de Pelotas. O fungo foi cultivado em meio BDA (Tuite, 1969)

juntamente com pequenos fragmentos de papel filtro (0,5 cm<sup>2</sup>), para preservação. Após a colonização do papel com propágulos fúngicos, eles foram submetidos a secagem sob temperatura de 28-30 °C durante 10 dias. Em seguida, os fragmentos foram depositados em microtubos do tipo *Eppendorf* (2 mL), e acondicionados em *freezer* a -10 °C (Barros Cortês *et al.*, 2010).

#### 4.2.3 Microbiolização de sementes

A cultura pura de cada isolado, mantida em crescimento por 24 h a 28 °C, foi suspensa (~10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>) em solução tampão-fosfato (PBS: 0,1 M; pH 7,0). Em seguida, a suspensão de células bacterianas foi adicionada em copos plásticos de 50 mL, contendo sementes de arroz previamente desinfestadas superficialmente (um minuto em álcool 70%, dois minutos em hipoclorito de sódio 1,5% e três lavagens em água destilada e esterilizada). As sementes em imersão foram mantidas sob agitação constante (Sheker Tecnal, TE 420) a 150 rpm a 25 ± 5 °C, por 24 h.

Paralelamente, as sementes foram imersas nos seguintes tratamentos: água destilada e esterilizada (controle), Solução Tampão-Fosfato (PBS) (0,1 M; pH 7,0), indutor de resistência Acibenzolar-S-metil (ASM; 0,05 g/L) e o indutor de resistência GreenForce (5 mL/L) e o fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram) (300 mL/100 Kg sementes).

As sementes após microbiolizadas foram pré-germinadas em placas de Petri contendo papel Germitest umedecido em água destilada esterilizada, durante 24 h a 25 ± 5 °C em fotoperíodo de 12 h, para assegurar a viabilidade das sementes utilizadas durante o teste.

#### 4.2.4 Bioensaio de antibiose

O teste de antibiose foi realizado como proposto por Vidaver *et al.* (1972). Uma camada básica de 6 mL de meio sólido 523 foi depositada em placas de Petri e quatro isolados endofíticos diferentes, foram repicados por pontos equidistantes, e incubados por 48 h a 28 °C. Após, as colônias crescidas foram mortas pela exposição a vapores de clorofórmio por uma hora e, por mais uma hora sob luz ultravioleta (UV). Paralelamente, propágulos do fungo *B. oryzae*, previamente cultivado, foram transferidos para Erlenmeyer contendo meio BDA semissólido fundente (45 °C; ágar a 0,8%; 0,250 g de estreptomicina por 500 mL

de meio). Em seguida, uma sobre-camada foi formada com o meio fundente sobre a camada básica contendo as colônias bacterianas mortas. Finalmente, as placas foram incubadas durante sete dias, em temperatura de  $25 \pm 5$  °C e fotoperíodo de 12 h, quando foi avaliada a inibição ou não do crescimento micelial do *B. oryzae*. Foram colocados à prova os 303 isolados endofíticos, e os tratamentos com PBS (0,1 M; pH 7,0), ASM (0,05 g/L), GreenForce (5 mL/L), fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram) (300 mL/100 Kg sementes) e água destilada esterilizada como controle negativo. O experimento contou com quatro repetições para cada tratamento, e quando o halo de inibição estava presente, esse foi mensurado em cm.

#### **4.2.5 Preparo das plantas em casa-de-vegetação**

Sementes de arroz foram desinfestadas superficialmente, microbiolizadas com suspensão bacteriana ( $\sim 10^8$  células/mL) de cada um dos isolados, mais os tratamentos água (controle), solução tampão fosfato (PBS: 0,1 M; pH 7,0), Acibenzolar-S-Metil (ASM; 0,05 g/L), GreenForce (5 mL/L) e Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram) (300 mL/100 Kg sementes). Em seguida, as sementes foram depositadas em papel Germitest, previamente umedecido com água destilada esterilizada, e mantidas por 24 h a  $25 \pm 5$  °C. Após, as sementes foram semeadas em copos plásticos (300 mL) contendo uma mistura de terra preta e húmus (Policultura Rosa), e permaneceram em casa-de-vegetação a  $25 \pm 5$  °C com 1/3 dos copos submersos em água. Em intervalos de sete em sete dias, as plantas foram suplementadas com 0,022 g de nitrogênio por copo. Cada tratamento contou com três repetições e cinco plantas por copo foram avaliadas.

#### **4.2.6 Inoculação do patógeno**

O fungo foi cultivado sobre ágar-água [2% (p/v)] a 25 °C por 10 dias, para produção das estruturas reprodutivas do patógeno. Após, 3 mL de água mineral foram adicionados sobre a cultura fúngica e uma raspagem por pincelamento foi realizada. Uma suspensão de conídios ( $3,0 \times 10^6$  conídios/mL) (mínimo sugerido por Alfenas & Ferreira, 2007 foi de  $1 \times 10^6$ ), foi obtida e suplementada com 0,05 g de gelatina (diluída em 1 mL de água mineral) para facilitar a aderência da suspensão de conídios na superfície da folha, mais uma gota do detergente

Tween 20 PA. Plantas em estágio fenológico V3 (três folhas verdadeiras, aproximadamente 14 dias de crescimento) foram expostas a condições de câmara-úmida ( $\geq 90\%$  de umidade) por 24 h e inoculadas por pulverização (W WIMPEL COMP-1). Após a inoculação, as plantas permaneceram por mais 24 h em condições de alta umidade (Bedendo & Prabhu, 2005), mantidas em casa-de-vegetação. As plantas com sintomas foram avaliadas aos 21 dias após a semeadura (sete dias após a inoculação) pela mensuração da severidade da doença de acordo com a escala diagramática proposta por Schwanck & Del Ponte (2014), com amplitude variando de 0,5 a 36%.

#### **4.2.7 Análise estatística**

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os resultados obtidos submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ) usando o programa estático Sisvar (Ferreira, 2011).

#### **4.2.8 Identificação das bactérias: extração do DNA e amplificação do fragmento gênico 16S rDNA**

Para extração do DNA genômico empregou-se o protocolo experimental de Woo *et al.* (1992). Para tanto, as colônias bacterianas que apresentaram bons resultados no teste em casa-de-vegetação, foram cultivadas em 5 mL de meio líquido 523 sob agitação (150 rpm) a 28°C. Após 24 h de incubação, foi transferido 1 mL de cultura bacteriana de cada isolado para microtubos (Eppendorf<sup>TM</sup>microcentrifuge, mod. 5415C) e centrifugado a 13.000 rpm por um minuto à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e dissolvido cuidadosamente o precipitado em 1 mL de tampão TNE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, NaCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA pH 8 10 mM). A suspensão de células bacteriana foi novamente concentrada através de centrifugação a 13.000 rpm, durante 1 minuto à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido vagorosamente em 135  $\mu$ L do tampão TNE. Em seguida foram adicionados 135  $\mu$ L de TNE com 2% de Triton X-100 e 30  $\mu$ L de lisozima (5 mg/mL). A solução foi misturada suavemente e incubados em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. Após a primeira incubação, 15  $\mu$ L de proteinase K (20 mg/mL) foi misturada por

inversão e os microtubos foram incubados novamente em banho-maria a 65°C durante 2 h.

Por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi procedida a amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA das bactérias 286, 76 e 74. A PCR foi composta de tampão 1X (Invitrogen), contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 50 mM de KCl; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA, sendo o volume final ajustado com água ultrapura para 20 µL. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nessa reação foram 27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG e 1525R AAGGAGGTGWTCCARCC, retirados do estudo de Palumbo *et al.* (2007). A reação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 55 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 90 s, seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 min (Palumbo *et al.*, 2007). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado pela comparação com o perfil eletroforético do marcador de massa molecular de 1 Kb (Promega) em gel de agarose a 1% em TBE 1X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2 mM de EDTA]. Adicionalmente, foi realizada a estimativa da concentração dos fragmentos amplificados. Para tanto, foram aplicados no gel 500 ng do marcador λHindIII. O gel foi deixado em contato com uma solução de tampão TBE 1X adicionada de brometo de etídio (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) por 10 min. Em seguida, o gel foi exposto a luz UV e fotografado. Por fim, os fragmentos amplificados a partir do DNA de cada bactéria foram submetidos ao sequenciamento. Esse último procedimento está sendo realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

### 4.3 Resultados

Dos 303 isolados endofíticos, no teste de antibiose, 25 inibiram eficientemente o crescimento micelial do fungo *B. oryzae* (Tabela 1). No entanto, os isolados 191 (Figura 1A) e 164 (Figura 1B) foram os que apresentaram a maior atividade inibitória frente o micélio fúngico, exibindo halos de 3,50 e 3,18 cm, respectivamente, quando comparados com o controle (água) (Figura 1C). À

exceção do tratamento com o fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram) os tratamentos com PBS, GreenForce e ASM não apresentaram atividade inibitória contra o patógeno desafiante (Tabela 1).

Na seleção massal, dos 303 isolados testados, 39 se destacaram por reduzir substancialmente a severidade da doença em média 89,75% em relação ao controle (100% de doença) (Tabela 2; Figura 1C). Destes, o controle máximo foi obtido com o isolado 286 (Figura 1E), que apresentou redução da severidade da mancha-parda em 96,6%. O tratamento com ASM apresentou 42,15% de redução da severidade, diferindo estatisticamente do controle. Os tratamentos com PBS e fungicida tiveram comportamento semelhantes, apresentando redução da severidade de 26 e 24,4%, comparativamente com o controle. Já o GreenForce não apresentou redução da severidade, sendo estatisticamente idêntico ao controle (Tabela 2). Os isolados 236, 335 e 80 que inibiram o crescimento micelial do patógeno, também se destacaram como bons biocontroladores da doença em condições de casa-de-vegetação (Figura 2).

Com relação à identificação dos isolados, o procedimento de sequenciamento encontra-se em andamento pela ACTGene Análises Moleculares Ltda.

#### 4.4 Discussão

Com base nos resultados apresentados é possível supor que a antibiose foi um fenômeno limitado, no que diz respeito ao controle *in vitro*, uma vez que 8,2% dos isolados manifestaram algum efeito inibitório sobre o crescimento micelial do patógeno. Naturalmente a antibiose não eleva o isolado ao *status* de um bom agente de biocontrole, pois outros fenômenos podem ocorrer com a introdução deste quando exposto a condições ambientais. Isso foi reportado por Romeiro *et al.* (2005) ao confrontarem, por antibiose, um isolado de *Bacillus pumilus* contra os patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), *Xanthomonas vesicatoria*, *Alternaria solani* e *Corynespora cassiicola*, que não apresentaram efeito inibitório. Mas quando a rizobactéria entrou em contato com o sistema radicular de plantas de tomate, promoveu o fenômeno de indução de resistência e indiretamente reduziu as doenças causadas por esses patógenos.

Outro aspecto relevante diz respeito ao efeito inibitório, que pode variar quanto ao tipo de patógeno desafiado. Isto talvez possa estar relacionado com a

capacidade ou incapacidade dos patógenos em driblar as substâncias tóxicas sintetizadas pelos antagonistas, assim realizando a detoxificação pela conversão de substâncias atóxicas ou alterando alvos das substâncias (Toyoda *et al.*, 1988; Kneusel *et al.*, 1994; Dickman & Chet, 1998; Thangavelu *et al.*, 2001).

Corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, Barretti *et al.* (2008) verificaram que, de dez isolados endofíticos submetidos ao teste de antibiose, somente dois (20%) inibiram o crescimento da fitobactéria *Ralstonia solanacearum*. Ainda confirmando esse número reduzido de isolados potencialmente antagonistas, Nejad *et al.* (2014) demonstraram que de 20 actinomicetos, cinco (25%) apresentaram atividade inibitória ao crescimento micelial do fungo *B. oryzae*. O fenômeno de antibiose está relacionado com a síntese de metabólitos secundários de natureza inibitória ou deletéria. Ongena *et al.* (2005) relatam o papel importante dos lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina sintetizados por espécies de *Bacillus* que apresentam efeito cabal sobre patógenos. Da mesma forma, Suciati *et al.* (2013) reportaram a atividade antagônica de bactérias endofíticas contra os patógenos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* pela síntese de iturina, surfactina e enzimas quitinolíticas. Embora não se tenha caracterizado as moléculas envolvidas no processo de antibiose, é possível que as mesmas façam parte dos grupos supramencionados por serem eles comumente sintetizados por diferentes gêneros de bactérias.

Na seleção massal em casa-de-vegetação, 39 isolados (12,87% do total) se destacaram como promissores, controlando em média 89,75% a severidade da doença. Embora muitos isolados tenham apresentado efeito satisfatório sobre a mancha-parda, faz-se necessário a repetição do ensaio. Isto porque, geralmente, na seleção massal cerca de 1 a 3% dos isolados são destaque como potenciais biocontroladores (Chen *et al.*, 1996). Há que se destacar que outros métodos de aplicação dos isolados pode levar a resultados diferentes dos apresentados pela microbiolização de sementes. Isto porque bactérias endofíticas, embora preferencialmente habitantes dos tecidos internos, podem permanecer por longo período na superfície foliar, quando dispensadas via pulverização (Lanna Filho *et al.*, 2013). Dessa forma, os isolados 236, 335 e 80 que inibiram o crescimento do patógeno e promoveram o controle da mancha-parda podem apresentar vantagens adicionais sobre aqueles que somente se destacaram em casa-de-

vegetação, certamente porque podem ter sucesso por exercerem outros mecanismos de biocontrole e serem versáteis no modo de dispensa.

Em estudo semelhante a esse, Silva *et al.* (2008) realizaram comparações entre os isolados que obtiveram sucesso *in vitro* e em casa-de-vegetação contra a fitobactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Os autores constataram que, dos 23 isolados que inibiram o crescimento do patógeno, apenas oito reduziram a severidade da pinta bacteriana do tomateiro.

Diversos pesquisadores têm a microbiolização de sementes como forma de dispensa preferencial (Naves *et al.* 2002; Pinho *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; e Ludwig *et al.*, 2013), pois o micro-organismo associado a semente tem a oportunidade de ser o primeiro a utilizar os exsudatos oriundos da germinação e colonizar rapidamente a espermosfera (Stirling, 1991). Porém, para o sucesso do método, o micro-organismo tem que ser um ótimo competidor e eliciador do fenômeno de indução de resistência. Isto porque deve ele permanecer viável frente à microbiota antagônica do solo e levar a planta ao “estado de indução” contra o patógeno.

É possível que os 39 isolados em destaque como biocontroladores tenham promovido a indução de resistência das plantas de arroz, pois, este é o mecanismo mais comumente observado por micro-organismos introduzidos via solo ou microbiolização. Isso ocorre porque, embora as bactérias endofíticas colonizem o interior da planta, muito dificilmente elas disputam nichos no filoplano colonizado pelo patógeno, evidenciando que os isolados bacterianos promissores podem desempenhar um papel importante no biocontrole da mancha-parda do arroz.

#### **4.5 Conclusões**

Em suma, conclui-se que dos isolados testados, alguns apresentaram potencial para atuar como agentes de biocontrole da mancha-parda em arroz, em que os isolados 191 e 164 apresentaram halos de inibição de 3,5 e 3,18 cm, respectivamente, se destacando dos demais no ensaio *in vitro*, e 39 isolados reduziram a severidade da doença em cada de vegetação.

**Agradecimentos**

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto desenvolvido e ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal e Biocontrole do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo suporte na execução dos experimentos.

#### 4.6 Referências Bibliográficas

- Alfenas AC, & Ferreira FA (2007) Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: Alfenas AC; Mafia RG. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, p. 117-138.
- Ba, VV, & Sangchot, S (2006) Seed borne and transmission of *Bipolaris oryzae*, the causal pathogen of brown spot of rice. **Nature Science** 40:353 – 360.
- Barnwal MK, Kotasthane A, Magculia N, Mukherjee PK, Savary S, Sharma AK, Singh HB, Singh US, Sparks AH, Variar M, Zaidi N (2013) A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. **European Journal of Plant Pathology** 136:443–457.
- Barretti PB, Romeiro RS, Mizubuti ESG, Souza JT (2009) Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia** 33:2038-2044.
- Barretti PB, Souza RM, Pozza EA (2008) Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia** 32:731–39.
- Barros Côrtes MVC, Duarte LT, Filippi MCC, Lôbo VLS, Prabhu AS, Gonçalves FJ, Freitas BR, Guimarães LAF, Wendland A (2010) A coleção de isolados de *Magnaporthe oryzae* da Embrapa Arroz e Feijão: **uma micoteca para uso na pesquisa com brusone**. Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2010. 20 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 259.
- Bedendo I, & Prabhu A (2005) Doenças do arroz (*Oryza sativa*). In: Kimati H, Amorim L, Rezende J, *et al.* (eds) **Manual de Fitopatologia**, 4th ed. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, p 79-90.
- Celmer A, Madalosso MG, Debortoli MP, Navarini L, Balardin RS (2007) Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42:901–904.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry** 42:669-78.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka EA (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology** 71:1685-1693.
- Chen Y, Mei R, Lu S, Liu L, Kloepper JW (1996) The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: R.S. Utkhede & V.K. Gupta (eds.). **Management of Soil Borne Diseases**, Kalyani Publishers, New Delhi, 165-184.

Conceição CL (1997) Ondas de calor e temperatura sensível em Porto Alegre (RS). Monografia (Graduação em Geografia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Dickman MB, & Chet I (1998) Biodegradation of oxalic acid: a potential new approach to biological control. **Soil Biology & Biochemistry** 30:1195–1197.

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1039-1042.

Kado CI, & Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969.

Kneusel RE, Schiltz E, Matern U (1994) Molecular characterization and cloning of an esterase which inactivates the macrolide toxin Brefeldin A. **The Journal of Biological Chemistry** 269:3449–3456.

Lanna Filho R, Souza RM, Ferreira A, Quecine MC, Alves E, Azevedo JL (2013) Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. **Australasian Plant Pathology** 42:643-651.

Lanna Filho R (2011) Controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* GFP-marcada) bacteriana do tomateiro por isolados endofíticos de *Bacillus* sp. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 108.

Lee FN (1992) Grain disease-grain discoloration. In: WEBSTER, R.K.; GRUNNEL, P.S. (ed.). **Compendium of Rice Diseases**. Saint Paul: APS Press, 62p.

Lelliott RAA, & Stead DE (1987) **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**. 216.

Lin T, Zhao L, Yang Y, Guan Q, Gong M (2013) Potential of endophytic bacteria isolated from *Sophora alopecuroides* nodule in biological control against *Verticillium* wilt disease. **Australian Journal of Crop Science** 7:139-146.

Ludwig J, Moura AB, Gomes CB (2013) Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology** 38:264-268.

Mano H, & Morisaki H (2008) Endophytic in the rice plant. **Microbes Environmental** 23:109-117.

Naves RL, Campos VP, Souza RM (2002) Antagonismo de bactérias endofíticas à formação de galhas e à reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira** 26:13-19.

Nejad MS, Bonjar GHS, Dehkaei FP (2014) Control of *Bipolaris oryzae* the causal agent of rice brown spot disease via soil *Streptomyces* Sp. isolate G. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research** 2:310-317.

Nawangsih AA, Damayanti I, Wiyono S, Kartika JG (2011) Selection and characterization of endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. **HAYATI Journal of Biosciences** 18:66-70.

Ongena M, Duby F, Jourdan E, Beaudry T, Jadin V, Dommes J, Thonart P (2005) *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology** 67:692-698.

Ou SH (1985) **Rice Diseases**. Kew UK. CAB International Mycological Institute.  
Paz ICP, Santin RCM, Guimarães AM, Rosa OPP, Dias ACF, Quecine MC, Azevedo JL, Matsumura ATS (2012) Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and Molecular Research** 11:3711-3720.

Prabhu AS, Fillipi MCC, Ribeiro AS (2006) Doenças e seu controle. In: SANTOS, A.B., STONE, L.F., VIEIRA, N.R.A. (eds) **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás/Goiás, Embrapa/CNPAF, pp 561–590.

Prabhu AS, & Filippi MC (2001) Graus de resistência à brusone e produtividade de cultivares melhoradas de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36:1453-1459.

Palumbo JD, O'keeffe TL, Abbas HK (2007) Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Journal of Food Protection** 70:1615-1621.

Pinho RSC, Campos VP, Souza RM, Silva JRC, Oliveira MS, Pimentel GCS, Costa SAS (2009) Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira** 33:54-60.

Purnawati A, Sastrahidayat IR, Abadi AL, Hadiastono T (2014) Endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. **The Journal Of Tropical Life Science** 4:33-36.

Ribeiro AS (1988) Doenças do arroz irrigado. Pelotas: Embrapa-CPATB, 56p. (Circular Técnica 2).

Romeiro RS (2001) **Métodos em bacteriologia de plantas**. 1st ed. 279.

Rosenblueth M, & Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 19:827-37.

Romeiro RS, Lanna Filho R, Vieira Junior JR, Silva HSA, Baracat-Pereira MC, Carvalho MG (2005) Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology** 153:120-123.

Santos GR, Café-Filho AC, Reis A (2006) Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 31:476-482.

Sartorato A (2006) Sensibilidade “*in vitro*” de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 36:211-213.

Savary S, Willocquet L, Elazegui FA, Castilla NP, Teng PS (2000) Rice pest constraints in tropical Asia: quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations. **Plant Disease** 84:357–369.

Silva JCM, & Coelho L (2003) Resistência a fungicidas de *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries fungo causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus* sp. em viveiros florestais. **Ciência Florestal** 13:27-36.

Silva HSA, Terrasan CRF, Tozzi JPL, Melo IS, Bettiol W (2008) Bactérias endofíticas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Tropical Plant Pathology** 33:049-054.

Silva JRC, Souza RM, Zacarone AB, Silva LHCP, Castro MAS (2008) Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência agrotecnologia Lavras** 32:1062-1072.

Schwanck AA, & Del Ponte E (2014) Accuracy and reliability of severity estimates using linear or logarithmic disease diagram sets in true colour or black and white: a study case for rice brown spot. **Journal of Phytopathology** 162:670–682.

Stirling GR (1991) **Biological Control of Plant Parasite Nematodes – Progress, Problems and Prospects**. Redwood Press, Mekshom, 282p.

Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J (2004) Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, 67:257-68.

Sturz AV, Christie BR, Nowak J (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable system of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences** 19:1–30.

Suciatmih Y, Supriyati D, Rahmansyah M (2013) Biodiversity of endophytic bacteria and their antagonistic activity to *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporium*. **Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences** 2:111-118.

Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W (2008) Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology** 55:415-24.

Sunder S, Singh R, Agarwal R (2014) Brown spot of rice: an overview. **Indian Phytopathology** 67:201-215.

Thangavelu R, Palaniswamy A, Ramakrishnan G, Sabitha Doraiswamy S, Muthukrishnan S, Velazhahan R (2001) Involvement of fusaric acid detoxification by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf10 in the biological control of *Fusarium* wilt of banana caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Journal for Plant Diseases and Plant Protection** 108:433–445.

Toyoda H, Hashimoto H, Utsumi R, Kobayashi H, Ouchi S (1988) Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of *Fusarium* wilt of tomato. **Phytopathology** 78, 1307–1311.

Tuite J (1969) **Plant Pathological Methods**, Burgess Pub. Company, Minneapolis. 239p.

Vidaver AK, Mathys ML, Thomas ME, Schuster ML (1972) Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola*. **Canadian Journal of Microbiology** 18:705-13.

Woo THS, Cheng AF, Ling JM (1992) An application of a simple method for the preparation of bacterial DNA. **BioTechniques** 13:696-698.

Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**. 52:487–511.

TABELA 1. Atividade inibitória de 25 isolados endofíticos dentre os 303 isolados testados contra o patógeno desafiante *B. oryzae*. Em vista de comparação, também foram testados os tratamentos: água (controle negativo), solução tampão-fosfato PBS, GreenForce, ASM e fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram).

<b>Antibiose <i>in vitro</i></b>			
<b>Tratamento</b>	<b>Média do Halo de Inibição (cm)</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Média do Halo de Inibição (cm)</b>
191	3,50 a	337	0,85 d
164	3,18 a	137	0,80 d
340	2,75 b	241	0,68 d
230	2,65 b	194	0,50 e
330	2,50 b	328	0,45 e
335	2,45 b	098	0,40 e
233	2,45 b	122	0,40 e
237	2,35 b	240	0,38 e
236	2,13 c	198	0,33 e
170	1,85 c	317	0,30 e
080	1,75 c	327	0,23 e
Fungicida	1,50 c	ASM	0,00 e
039	1,38 c	GreenForce	0,00 e
243	1,33 c	PBS	0,00 e
155	1,13 c	Água	0,00 e
<b>CV (%)</b>		<b>26,03</b>	

\*Médias com as mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

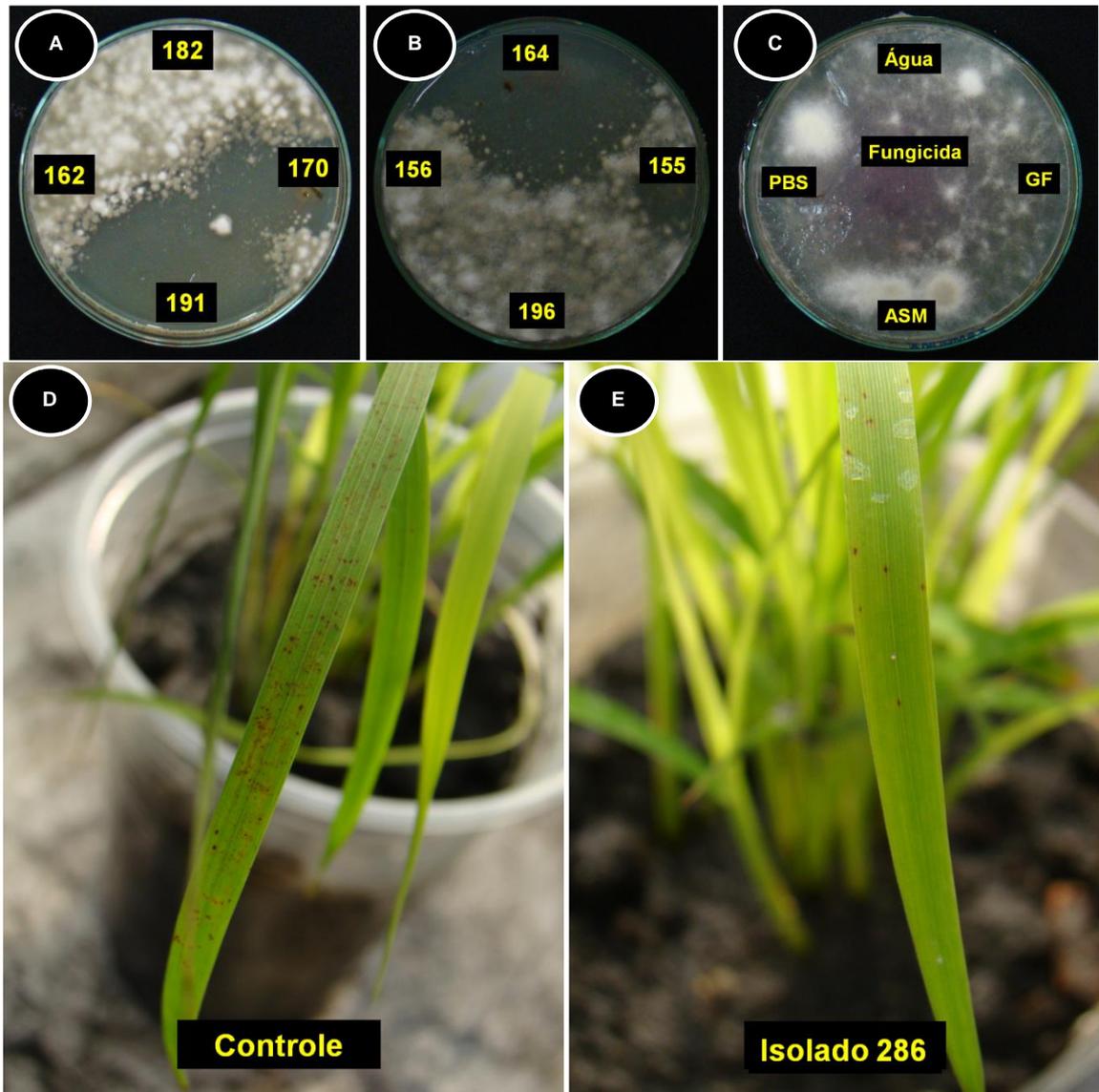


FIGURA 1. Antibiose *in vitro* e severidade em casa-de-vegetação. Halo de inibição dos isolados com maior atividade antagônica ao patógeno *B. oryzae*. A – Halo de inibição do isolado 191 (3,50 cm). B – Halo de inibição do isolado 164 (3,18 cm). C – Ausência de halo de inibição nos tratamentos controle (água), ASM, PBS e GreenForce e presença de halo (1,50 cm) no tratamento com fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram) (Fung.). Severidade da mancha-parda em folhas de arroz com 21 dias de idade. D – Tratamento controle (água), considerado como 100% de doença. E – Tratamento com a bactéria endofítica 286, considerada uma das mais eficientes.

TABELA 2. Severidade da mancha-parda (Sev) em folhas de arroz em casa-de-vegetação, órgão do hospedeiro (OH) em que foram isoladas as endofíticas e avaliação da presença ou ausência de halo de inibição micelial, decorrente dos tratamentos com os isolados endofíticos, PBS, ASM, GreenForce (GF), Fungicida (Fung: Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram) e água (controle).

Trat	Sev (%)	OH	Inibição micelial	Trat	Sev (%)	OH	Inibição micelial
286	0.26 a*	Raiz	-**	234	0.90 a*	Raiz	-**
76	0.29 a	Raiz	-	148	0.93 a	Colmo	-
74	0.37 a	Colmo	-	167	0.93 a	Colmo	-
81	0.47 a	Raiz	-	106	0.97 a	Colmo	-
344	0.50 a	Raiz	-	36	0.98 a	Raiz	-
121	0.50 a	Raiz	-	130	0.99 a	Raiz	-
236	0.52 a	Raiz	+	239	0.99 a	Raiz	-
120	0.53 a	Raiz	-	71	1.00 a	Raiz	-
203	0.53 a	Colmo	-	79	1.00 a	Colmo	-
100	0.61 a	Colmo	-	207	1.01 a	Colmo	-
127	0.62 a	Raiz	-	221	1.03 a	Colmo	-
54	0.65 a	Raiz	-	252	1.03 a	Raiz	-
109	0.67 a	Colmo	-	102	1.03 a	Colmo	-
335	0.67 a	Raiz	+	309	1.05 a	Raiz	-
53	0.68 a	Colmo	-	135	1.05 a	Colmo	-
235	0.75 a	Raiz	-	73	1.05 a	Colmo	-
140	0.76 a	Raiz	-	125	1.05 a	Raiz	-
343	0.83 a	Colmo	-	ASM	4.76 b	—	-
105	0.83 a	Colmo	-	PBS	5.71 c	—	-
139	0.85 a	Colmo	-	Fung	5.83 c	—	+
323	0.87 a	Raiz	-	GF	7.54 d	—	-
80	0.89 a	Colmo	+	Água	7.71 d	—	-
<b>CV (%)</b>		<b>75.60</b>					

\*Médias com as mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

\*\* (+) = Isolados que apresentaram inibição do crescimento micelial. (-) = isolados que não apresentaram inibição do crescimento micelial.

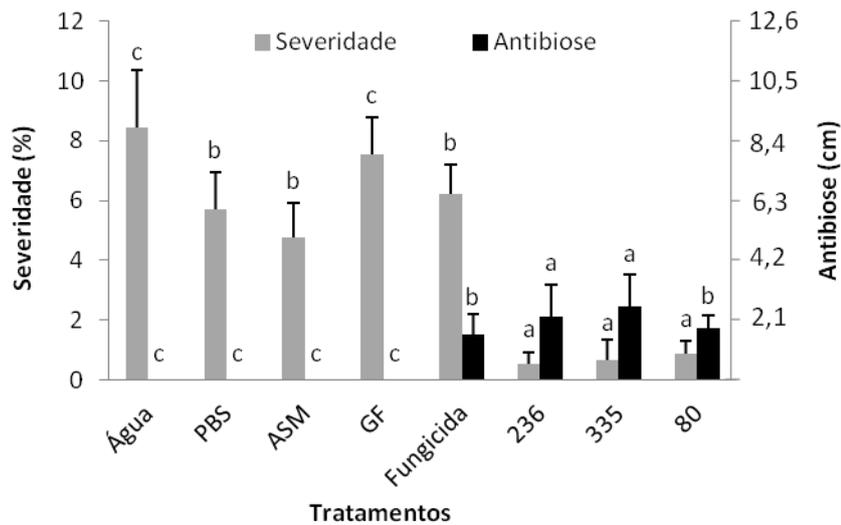


FIGURA 2. Inibição do crescimento micelial e redução da severidade de mancha-parda pelos isolados 236, 335 e 80, comparativamente com os tratamentos controle (água), Solução Tampão-Fosfato (PBS), Acibenzolar-S-metil (ASM), GreenForce (GF) e Fungicida Carboxanilida (Carboxina) + Dimetilditiocarbamato (Tiram). As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com a realização desse estudo, foi possível selecionar isolados de bactérias endofíticas capazes de atuar como agentes de biocontrole e também como promotores de crescimento de plantas de arroz, em que se demonstrou a sua eficiência nos ensaios realizados. Os isolados que obtiveram sucesso no biocontrole da mancha-parda obtiveram redução média da severidade de até 89,75%, enquanto que os que apresentaram potencial para promoção de crescimento foram promissores em estimular o aumento da altura das plantas em até 12,48 cm, número de folhas, peso da massa fresca da raiz, com incrementos de 202,5% e peso da massa fresca da parte aérea, com incrementos de até 342,8% comparativamente com o tratamento controle.

Desta forma, pretende-se com esses resultados, realizar estudos futuros de indução de resistência para saber quais mecanismos de defesa estão sendo ativados na planta pelos melhores isolados, bem como elucidar quais substâncias estimuladoras de crescimento são produzidas pelos promotores de crescimento. Notadamente, vislumbrando o desenvolvimento de um bioproduto e biofertilizante com vistas à comercialização.