

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



**Dissertação**

**Indução de resistência por rizobactérias como mecanismo  
de controle biológico de doenças do arroz**

**Jaqueline Tavares Schafer**

Pelotas, 2011

**Jaqueline Tavares Schafer**

**Indução de resistência por rizobactérias como mecanismo  
de controle biológico de doenças do arroz**

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

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Andréa Bittencourt Moura

Co-orientador: Dr. Marcos Antônio Bacarin

Pelotas, 2011

## Dados de catalogação na fonte:

( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S296i Schafer, Jaqueline Tavares

Indução de resistência por rizobactérias como mecanismo de controle biológico de doenças do arroz / Jaqueline Tavares Schafer ; orientador Andréa Bittencourt Moura; co-orientador Marcos Antônio Bacarin . - Pelotas,2011.-62f. ; il.-  
Dissertação ( Mestrado ) –Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.*Oryza sativa* 2.*Bipolaris oryzae* 3.*Gerlachia oryzae*  
4.ISR 5.Atividade enzimática I Moura, Andréa Bittencourt (orientador) II .Título.

CDD 633.18

Banca examinadora:

Prof. Dr<sup>a</sup>. Andréa Bittencourt Moura - Orientadora - FAEM/UFPeI

Dr<sup>a</sup>. Bianca Obes Corrêa – FAEM/UFPeI

Prof. Dr<sup>a</sup>. Cândida Renata Jacobsen Farias – FAEM/UFPeI

Prof. Dr<sup>a</sup>. Norimar D'Ávila Denardin – UPF

*Ao meu pai Gleni Paulo  
Que hoje está espiritualmente ligado e presente, vivo em meu coração, contribuindo  
com sua força e seus eternos ensinamentos;*

*A minha mãe Zilda  
Por ser tão guerreira e não ter deixado meus sonhos se perderem na ilusão,  
segurando forte como as mãos de Deus.*

*Com muito amor*

*Dedico*

## **Agradecimentos**

À Deus, por ter me concedido a vida, me dado a graça de poder concluir mais esta etapa.

À minha irmã Bárbara, pela paciência e ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Rogério, pela paciência e pelo amor eterno, fazendo com que a alegria estivesse presente em todos os momentos.

À Prof. Dra. Andréa Bittencourt Moura pelos ensinamentos, amizade, paciência e carinho, e acima de tudo, pela confiança e orientação durante todos estes anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Bacarin pela co-orientação, ensinamentos e dedicação para execução de grande parte deste trabalho.

Aos professores Danilo Dufech Castilhos, Danielle Ribeiro Barros e Cândida Renata Jacobsen Farias pela disponibilidade em ajudar em todos os momentos.

Aos Professores do Departamento de Fitossanidade e Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, pelos ensinamentos profissionais e pessoais e pelo convívio.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuição no trabalho.

Às funcionárias Rosária Helena e Mariane Rosenthal do Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário pelas ajudas constantes.

Ao secretário do PPGFs, Gustavo dos Santos, por estar sempre disposto a ajudar e pela amizade construída.

Ao funcionário Rubilar (Laco), do Departamento de Fitotecnia, pela ajuda para conseguir o solo para montagem dos experimentos.

Aos amigos Sérgio Freitas e Ana Paula Schneid Afonso, pela convivência e constante amizade, tanto nos momentos difíceis quanto nos momentos felizes.

Ao casal de amigos do coração, Bianca e Adriano, por estarem sempre ao meu lado, dispostos a ajudar e compartilhar momentos inesquecíveis... muito obrigada!

A minha estagiária, e eterna amiga, Lauren Fonseca Anacker, pela competência e infinita ajuda para execução deste trabalho... sem palavras para agradecer!

Aos amigos e estagiários do laboratório Fábio Sérgio Paulino, Renato Buss, Paulo Benedeti, Marcio Wissmann, Cibeli Campesato, Aline Garske, Rafael Nunes e Stefânia Moreno, pelo convívio, apoio e amizade. Agradeço pelo apoio e garra para que este trabalho fosse concluído.

Aos amigos e colegas de curso Ismail Teodoro, Ivani Titia, Elisandra Minotto, Caroline Wille, Dediel Rocha, Israel Medina, Victor Hugo Coila, Josiane Casarin, Lucia Somavilla, Clarice Manzoni, Gisela Torchelsen, Tânia Bayer e Monalize Mota pelo companheirismo e ajuda para que eu pudesse chegar até aqui.

À Universidade Federal de Pelotas, à minha querida Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel pela oportunidade de me tornar Agrônoma e, ao Departamento de Fitossanidade, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Enfim, agradeço imensamente àquelas pessoas que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu pudesse concluir mais uma etapa em minha vida. O meu “muito obrigada” aos que seguem aqui na Terra, ligados carnalmente, e também, aos que espiritualmente mostram-me que, a vida segue, e que os ensinamentos não tem fim, que tudo que temos de tão maravilhoso, deve-se ao mérito conquistado pela longa caminhada e infinito aprendizado.

## **Biografia**

Jaqueline Tavares Schafer, filha de Gleni Paulo Corrêa Schafer (*in memoriam*) e Zilda Tavares Schafer, nasceu na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, em 18 de dezembro de 1983.

Em 2002 ingressou na Universidade Federal de Pelotas – Pelotas (RS) onde se graduou em Agronomia, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em 16 de agosto de 2008.

Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, nível de Mestrado, na área de conhecimento Fitopatologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Pelotas (RS), concluindo-o em março de 2011.

## Resumo

Schafer, Jaqueline Tavares. **Indução de resistência por rizobactérias como mecanismo de controle biológico de doenças do arroz.** 2011. 62f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A cultura do arroz irrigado está sujeita à ocorrência de várias doenças que provocam perdas na produtividade das lavouras. Atualmente buscam-se alternativas para o controle destas doenças, sendo o biocontrole uma possibilidade viável. O objetivo deste trabalho foi de comparar o controle da mancha parda e da escaudadura do arroz proporcionado por rizobactérias isoladas e em combinações, seu impacto sobre a produção de grãos, bem como o envolvimento da indução de resistência associado à atividade de catalases e peroxidases. Utilizaram-se as rizobactérias DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*P. fluorescens*), DFs306 (não identificado), DFs416 e DFs418 (*Bacillus* sp.), e algumas combinações destas. Sementes de arroz da cultivar El Paso 144L foram imersas nas suspensões ( $A_{540}=0,5$ ) de cada um dos tratamentos bacterianos e agitados por 30'/10°C. Sementes imersas somente em solução salina e em salina mais fungicida foram usadas como testemunha. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com avaliação da severidade das doenças, em dois ensaios distintos. O primeiro foi conduzido até a produção e o segundo, as plantas foram coletadas em três diferentes tempos para verificar a atividade enzimática (0 h antes da inoculação, 24 e 168 h após). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. De modo geral, os tratamentos bacterianos foram capazes de controlar ambas as doenças, exceto DFs306 que não proporcionou controle efetivo da mancha parda no primeiro ensaio. Nas plantas inoculadas com *Bipolaris oryzae*, nenhum tratamento foi capaz de aumentar a produção de grãos ou grãos com menor intensidade de manchas. Já nas plantas inoculadas com *Gerlachia oryzae*, todos os tratamentos avaliados resultaram em aumento de pelo menos uma variável relacionada à produção. Em geral, foi possível associar a participação das enzimas avaliadas ao controle proporcionado por alguns tratamentos. Assim, acredita-se que os tratamentos bacterianos, individuais e combinados, possuem potencial de controle da mancha parda e da escaudadura e capacidade para induzir resistência pela alteração da atividade de catalases e peroxidases.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, *Bipolaris oryzae*, *Gerlachia oryzae*, ISR, atividade enzimática, catalases, peroxidases.

## Abstract

Schafer, Jaqueline Tavares. **Induction of resistance by rhizobacteria as a mechanism for biological control of rice.** 2011. 62f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The rice crop is subject to the occurrence of various diseases that cause yield losses of crops. Currently is seeking alternative ways to control these diseases, and biocontrol a viable possibility. The aim of this study was to compare the control of brown spot and leaf scald of rice provided by rhizobacteria isolated and combined, their impact on grain production, as well as the involvement of induced resistance associated with the activity of catalases and peroxidases. We used the DFs185 rhizobacteria (*Pseudomonas synxantha*) DFs223 (*P. fluorescens*), DFs306 (not identified), and DFs416 DFs418 (*Bacillus* sp.). And some combinations of these. Rice seeds of El Paso 144L were immersed in suspensions ( $A_{540} = 0.5$ ) for each of the bacterial treatments and agitated for 30'/10°C. Seeds immersed in saline and saline plus fungicide were used as control. The experiment was conducted in a greenhouse, with assessment of disease severity in two separate trials. The first was conducted by the production and second, plants were collected at three different times to check the enzyme activity (0 h before inoculation, 24 and 168 h after). The experimental design was completely randomized. In general, the bacterial treatments were able to control both diseases, except DFs306 not provided effective control of brown spot in the first trial. In plants inoculated with *Bipolaris oryzae*, no treatment was able to increase production of grains or grains with lower intensity of staining. Already in plants inoculated with *Gerlachia oryzae*, all treatments resulted in increase of at least one variable related to production. In general, it was possible to associate the participation of enzymes evaluated the control provided by some treatments. Thus, it is believed that the bacterial treatments, individual and combined, have the potential to control brown spot and leaf scald and ability to induce resistance by altering the activity of catalases and peroxidases.

Keywords: *Oryza sativa*, *Bipolaris oryzae*, *Gerlachia oryzae*, ISR, enzymatic activity, catalases, peroxidases.

## Sumário

<b>1-</b>	<b>Introdução Geral.....</b>	<b>11</b>
<b>2-</b>	<b>Capítulo 1 – Indução de resistência contra mancha parda do arroz pelo uso de rizobactérias isoladas e em combinação.....</b>	<b>14</b>
2.1-	Introdução.....	14
2.2-	Material e Métodos.....	17
2.3-	Resultados e Discussão.....	22
2.4-	Conclusão.....	32
<b>3-</b>	<b>Capítulo 2 – Indução de resistência pelo uso de bactérias isoladas e em combinação contra a escaudadura do arroz.....</b>	<b>33</b>
3.1	Introdução.....	33
3.2	Material e Métodos.....	35
3.3	Resultados e Discussão.....	40
3.4	Conclusão.....	49
<b>4-</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>50</b>
<b>5-</b>	<b>Referências.....</b>	<b>51</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>59</b>

## 1 – Introdução Geral

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos mais importantes cultivos alimentares em todo o mundo, sendo o Brasil um dos principais produtores. A produção nacional na safra 2009/2010 foi de 11.260,3 mil toneladas e a produtividade de 4.073Kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2010). O sistema de cultivo irrigado, tradicionalmente praticado na Região Sul do Brasil, tem contribuído com a maior parte da produção nacional, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro.

A cultura do arroz irrigado está sujeita à incidência de diversas doenças, que resultam em perdas na produtividade das lavouras. Entre as doenças que ocorrem nas lavouras do Rio Grande do Sul, destacam-se as manchas foliares: brusone, mancha parda e escaudadura (FRANCO et al., 2001; CELMER et al., 2007).

A brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. (teleomorfo: *Magnaporthe grisea* Barr.), é considerada a doença mais importante na maioria dos países produtores de arroz, inclusive no Brasil. Este patógeno é altamente destrutivo quando infecta cultivares suscetíveis (NUNES; RIBEIRO; TERRES, 2004). O fungo pode infectar folhas, colmo e panículas, levando a perdas que podem chegar a 100% quando as condições são favoráveis (PRABHU et al., 2003).

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [(teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi)], agente causal da mancha parda, provoca maiores danos durante a germinação das sementes, levando as plântulas à morte, reduzindo o estande (RIBEIRO, 1988; BEDENDO; PRABHU, 2005). Ocorre também como manchas necróticas nas folhas de plantas adultas, aumentando a esterilidade das flores (OU, 1985), reduzindo o número de grãos por panícula e originando grãos menores e manchados (LEE, 1992).

A escaudadura incitada por *Gerlachia oryzae* (Hashioka & Yokogi) W. Gams [(teleomorfo: *Monographella albescens* (Thumen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth)

(sinonímia: *Rhynchosporium oryzae*, *Microdochium oryzae*)], vem ocorrendo em níveis elevados em todas as regiões orizícolas do Brasil, estando associada ao uso de cultivares suscetíveis e à adubação nitrogenada excessiva (EMBRAPA, 2005). Os sintomas ocorrentes nas plântulas são podridão da radícula e do coleóptilo. Nas folhas, a doença manifesta como lesões necróticas que se desenvolvem a partir do ápice e/ou bordos, levando à redução da área fotossintetizante e esterilidade de flores, manifestando-se principalmente nas fases de perfilhamento e emborrachamento (PRABHU; FILIPPI, 1997).

O uso de cultivares resistentes seria o método mais econômico e eficiente a ser utilizado para o controle destas doenças. No entanto, a obtenção dessas cultivares e manutenção de sua resistência são limitadas devido à ocorrência de adaptações nas populações dos patógenos (NUNES; CARVALHO; OLIVEIRA, 2007).

Portanto, na maioria dos casos, para o controle dessas doenças é necessário a aplicação de fungicida protetor ou sistêmico, com o intuito de reduzir o inóculo. No entanto, o controle químico contamina o ambiente, expõe quem aplica o produto, resulta em desequilíbrio ambiental, além de elevar os custos de produção. Por outro lado, a exigência dos consumidores por alimentos livres de agrotóxicos cresce a cada dia, o que juntamente com os demais aspectos citados, tem levado à busca por alternativas para o controle destas doenças.

Biocontroladores, principalmente espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas*, têm sido usados em alguns países para o controle de doenças do arroz, sendo aplicados principalmente por microbiolização das sementes. Nestes casos, exemplos de patógenos controlados são: *P. grisea* (VIDHYASEKARAN et al., 1997), *Rhizoctonia solani* Kuhn (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) (NANDAKUMAR et al., 2001, COMMARE et al., 2002, WIWATTANAPATAPEE et al., 2004), *Meloidogyne graminicola* Golden e Birchfield (PADGHAM; SIKORA, 2006) e *Fusarium moniliforme* Sheldon (ROSALES; MEW, 1997),

No Brasil, o Grupo de Pesquisa em Bactérias Biocontroladoras e Promotoras de Crescimento Vegetal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) selecionou bactérias que apresentam potencial para o controle de *B. oryzae* e *G. oryzae* (LUDWIG et al., 2009), *Rhizoctonia solani* (LUDWIG; MOURA, 2007), *M. graminicola* e *P. oryzae* (SOUZA JÚNIOR, 2010).

O controle biológico apresenta como aspectos positivos o baixo custo econômico e ambiental, porém, ao contrário do controle químico, raramente é espetacular (BETTIOL, 1991) além de, em muitos casos, não apresentar estabilidade de resultados a campo. Para superar estas limitações, tem-se adotado a estratégia da utilização de combinação de biocontroladores eficientes (DUNE et al., 1998; GUETSKY et al., 2001; DE BOER et al., 2003).

Os agentes de biocontrole de doenças podem atuar por diversas formas, dentre elas: antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência. A presença de mais de um mecanismo de ação em um mesmo indivíduo é vista como uma característica favorável para a eficiência, estabilidade e inespecificidade do biocontrole. Como a probabilidade de um único microrganismo atuar pelos diferentes mecanismos é pequena, utiliza-se a estratégia de combinar biocontroladores com diferentes mecanismos de ação.

As bactérias selecionadas pelo grupo de pesquisa da UFPel atuam individualmente por diferentes mecanismos. Estas são capazes de produzir antibióticos ativos contra os principais patógenos do arroz, sideróforos e algumas enzimas relacionadas ao biocontrole, bem como alterar metabolismo das plantas microbiolizadas, aumentando proteínas relacionadas à patogênese. Também mostraram capacidade de colonizar o sistema radicular de plantas de arroz, estando associadas à promoção de crescimento (LUDWIG; MOURA, 2009).

A combinação das referidas bactérias proporcionou o controle de maior número de doenças (ampliação de espectro de ação) e ou maior intensidade de controle destas (SOUZA JUNIOR, 2010; SOUZA JUNIOR et al., 2010). No entanto, não foi avaliado o impacto deste controle sobre a produção e tão pouco estabelecido qual(is) mecanismo(s) foi(ram) possivelmente responsável(eis) pelo controle.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do biocontrole da mancha parda e escaldadura sobre a produção de arroz e estudar o envolvimento da indução de resistência quando do uso de combinações das bactérias biocontroladoras selecionadas pelo grupo de pesquisa da UFPel.

## 2 – Capítulo 1

### Indução de resistência contra mancha parda do arroz pelo uso de rizobactérias isoladas e em combinação

#### 2.1 – Introdução

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi)], agente etiológico da mancha parda, está amplamente distribuído nas regiões orizícolas do mundo, assumindo posição de principal doença do arroz em algumas regiões (NUNES; RIBEIRO; TERRES, 2004). No Brasil, esta doença causa grandes danos em lavouras de arroz irrigado no Rio Grande do Sul, principalmente durante a fase de germinação das sementes, resultando em morte das plântulas e redução do estande de plantas (RIBEIRO, 1988; BEDENDO; PRABHU, 2005). Os sintomas, nas folhas, surgem como manchas de forma ovalada, com coloração marrom avermelhada, geralmente com o centro acinzentado, onde se encontram as estruturas reprodutivas do patógeno. Essa doença ainda afeta a formação dos grãos, que geralmente têm peso reduzido ou são chochos e, apresentam manchas de coloração marrom (LEE, 1992), que geralmente depreciam o produto e geram perdas durante o beneficiamento (PRABHU; FILIPPI; RIBEIRO, 1999).

O controle da doença geralmente é realizado pelo plantio de cultivares resistentes e ou pulverização de fungicidas (PRABHU; FILIPPI, 2001). No entanto, a vida útil destas cultivares não é longa e o uso de fungicidas implica na contaminação do ambiente. O uso indiscriminado destes produtos tem possibilitado o surgimento de populações resistentes do patógeno, reduzindo a eficiência do controle químico

(SILVA; COELHO, 2003; SANTOS; CAFÉ FILHO; REIS, 2006; SARTORATO, 2006; CELMER et al., 2007).

Como alternativa, estudos apontam o uso de microrganismos para o controle de diferentes fitopatógenos em arroz (ROSALES; MEW, 1997; VIDHYASEKARAN et al., 1997, WIWATTANAPATAPEE et al., 2004; PADGHAM; SIKORA, 2006; LUDWIG; MOURA, 2007; SOUZA JÚNIOR et al., 2010). Dados promissores foram encontrados para o controle da mancha parda utilizando rizobactérias (LUDWIG et al., 2009; LUDWIG, 2009) ou combinação destas (SOUZA JÚNIOR, 2010). Rizobactérias quando utilizadas individualmente resultaram em diferentes porcentagens de controle em diferentes anos de cultivo, configurando instabilidade de biocontrole. Por outro lado, a combinação de biocontroladores geralmente reduz este comportamento instável (SCHISLER; SLININGER; BOTHAST, 1997; RAUPACH; KLOEPPER, 1998; CORRÊA et al., 2008; MAKETON; APISITSANTIKUL; SIRIRAWEEKUL; 2008), pois agrega diferentes mecanismos de ação, como a competição, parasitismo, antibiose e a indução de resistência, sendo utilizada também como tática no aumento de produção (JACOBSEN; BACKMAN, 1993; LEWIS; FRAVEL; PAPAVIDAS, 1995).

A indução de resistência de plantas a patógenos pode ser alcançada através do tratamento com microrganismos ou seus produtos (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998) e consiste em ativar mecanismos de defesa da planta ou parte desta (AGRIOS, 2005). Dentre os microrganismos mais estudados com este propósito estão as rizobactérias (LEEMAN et al., 1995; LIU; KLOEPPER; TUZUN, 1995a,b) que ativam genes envolvidos na síntese de compostos, que possibilitam à planta sobreviver ao ataque do patógeno formando barreiras físicas e/ou ativando mecanismos de defesa pela produção de diversas proteínas relacionadas à resistência.

Dentre as proteínas relacionadas à indução de resistência encontram-se catalases e peroxidases, que desempenham papel importante na destruição das espécies ativas de oxigênio produzidas sob infecção por patógenos bem como, em resposta a estresses abióticos (BUCHANAN; BALMER, 2005).

As peroxidases também estão envolvidas em reações de lignificação (STICHER; MAUC-MANI; METRAUX, 1997) que tornam a parede celular da planta mais resistente a enzimas líticas produzidas pelos patógenos; reduz a disponibilidade de nutrientes dos tecidos do hospedeiro para o patógeno; e reduz a

difusão de toxinas produzidas pelos patógenos para os tecidos vegetais (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Este trabalho teve como objetivo, comparar o controle da mancha parda do arroz proporcionado por rizobactérias isoladas e em combinações, o impacto destas sobre a produção de grãos, bem como o envolvimento da indução de resistência associado à atividade de catalases e peroxidases.

## 2.2 – Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casa de vegetação não climatizada, do Departamento de Fitossanidade, e no Laboratório de Metabolismo Vegetal do Departamento de Botânica, pertencentes à Universidade Federal de Pelotas.

### 2.2.1 – Isolados utilizados e sua manutenção

As rizobactérias utilizadas nos ensaios (Tab. 1) fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas e foram selecionados para o controle da mancha parda, brusone, escaldadura, queima das bainhas e meloidoginose por Ludwig (2009) de forma isolada e em combinação por Souza Júnior (2010).

Tabela 1 – Identificação e habitat dos isolados bacterianos utilizados para microbiolizar sementes de arroz

Isolados	Identificação*	Habitat
DFs185	<i>Pseudomonas synxantha</i> (Ehrenberg) Holand	Semente de arroz
DFs223	<i>P. fluorescens</i> Migula	Semente de arroz
DFs306	Não identificado	Semente de cebola
DFs416	<i>Bacillus</i> sp. Cohn	Contaminante indicador de antibiose
DFs418	<i>Bacillus</i> sp. Cohn	Contaminante indicador de antibiose

\*Determinados por sequenciamento do gene 16S DNA (dados não publicados)

As rizobactérias têm sido mantidas por três métodos: em tubos com tampa rosqueável, contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) em geladeira; em água

destilada estéril sob condições ambientes e emulsificadas em glicerina em freezer (ROMEIRO, 2001).

O fungo *B. oryzae* foi isolado de folhas de plantas de arroz com lesões típicas da doença e mantido em tubos contendo meio BDA (batata dextrose ágar) (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) sob óleo mineral e em água destilada esterilizada, sob condições de refrigeração.

### **2.2.2 – Preparo das suspensões e microbiolização das sementes**

Suspensões das rizobactérias foram preparadas com solução salina (NaCl 0,85%) a partir de culturas com 24 h de crescimento em meio sólido 523 (KADO; HESKETT, 1970) a 28°C. A concentração da suspensão de cada bactéria foi ajustada em espectrofotômetro para  $A_{540}=0,5$ . As combinações foram obtidas a partir de suspensões das rizobactérias preparadas individualmente, sendo as concentrações ajustadas, para posteriormente misturá-las em volumes iguais.

Para microbiolização, as sementes de arroz, da cultivar El Paso 144L, foram imersas nas suspensões durante 30 minutos, sob agitação, a temperatura de 10°C. Os tratamentos utilizados foram: DFs185, DFs223, DFs306, DFs416, DFs418, DFs185/DFs306/DFs416, DFs185/DFs416/DFs418, DFs306/DFs416/DFs418. As testemunhas foram constituídas de sementes tratadas apenas com solução salina (T).

Também foi utilizado um tratamento com fungicida na concentração correspondente a 3mL Kg<sup>-1</sup> de sementes, segundo indicação de Embrapa (2005) onde as sementes foram imersas em solução salina mais Vitavax Thiran<sup>®</sup> (Carboxin + Thiran) (T+F).

### **2.2.3 – Plantio e condução dos ensaios**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação não climatizada, em dois diferentes ensaios, em anos diferentes: o primeiro, em vasos de 7Kg de solo, enquanto que, o segundo, em vasos de 1Kg de solo. O solo utilizado foi do tipo Planossolo, não esterilizado, sendo corrigido o teor de macronutrientes conforme Comissão..., (2004) (ANEXO A). Para ambos os ensaios, foram depositadas seis sementes por vaso.

Após emissão da segunda folha (estádio V2) (COUNCE; KEISLING; MITCHELL, 2000), realizou-se o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Para

o primeiro ensaio, a inundação ocorreu quando as plantas encontravam-se no estágio de desenvolvimento V6. No segundo ensaio não foi realizada a inundação dos vasos, visto que as avaliações ocorreram em V4-V5.

#### **2.2.4 – Inoculação**

Os esporos utilizados foram obtidos de colônias puras de *B. oryzae* após 15 dias de incubação. A concentração da suspensão foi calculada em câmara de Neubauer e ajustada para uma concentração de  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 horas antes e 48 horas após a inoculação. Para o primeiro ensaio, a inoculação ocorreu em plantas de arroz no estágio V6, e para o segundo ensaio, no estágio V4.

#### **2.2.5 – Avaliações**

##### **2.2.5.1 – Primeiro ensaio**

A severidade da mancha parda foi avaliada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação segundo escala desenvolvida por IRRI (1975) onde: 1 = manchas do tamanho da cabeça de um alfinete; 5 = manchas de cor café, com o centro acinzentado; 9 = manchas grandes, de cor café, com centro acinzentado. Foi calculada a Área Abaixo a Curva de Progresso da Doença (AACPD) a partir dos valores de severidade anotados nos três dias de avaliação utilizando-se o programa Gwbasic (MAFFIA, 1986).

Ao final do cultivo, para avaliar a produção, foi contado o número de panículas por planta. Posteriormente os grãos foram colhidos e contados os grãos cheios, e determinada sua massa seca em estufa com circulação de ar forçado, à temperatura de 25°C (grãos, grãos cheios e grãos chochos). Adicionalmente foi avaliada a severidade de manchas nos grãos, atribuindo-se notas de 1 a 9, em relação à porcentagem de grãos manchados, segundo escala diagramática desenvolvida por IRRI (1975) (ANEXO B).

##### **2.2.5.2 – Segundo ensaio**

A severidade da mancha parda foi avaliada nos mesmos dias do primeiro ensaio, usando escala desenvolvida por Ribeiro (não publicado) (ANEXO C) para avaliar plântulas e plantas até o início do perfilhamento onde se atribuiu as seguintes notas: 0 = sem incidência, 1 = plantas com até 1% da área foliar afetada; 3= 1 à 5%

da área foliar afetada; 5 = 5 à 25% da área foliar afetada; 7= 25 à 50% da área foliar afetada e 9 = plantas com mais de 50% da área foliar afetada.

### **2.2.6 – Quantificação da atividade enzimática de peroxidases e catalases**

Coletaram-se folhas de arroz obtidas de plantas, do segundo ensaio, provenientes de sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, em três diferentes tempos: 0 hora imediatamente antes da inoculação do patógeno, 24 horas e 168 horas após a inoculação. As amostras coletadas foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente foram avaliadas quanto ao teor de proteínas solúveis (PST) e à atividade de peroxidases e catalases.

Para a obtenção do extrato enzimático bruto, aproximadamente 250 mg da folha, foram maceradas em 5 mL de tampão Tris-HCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,2 contendo 0,1% de polivilpirolidona e 0,05 % de EDTA, seguida de centrifugação a  $10.000 \text{ g}$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado (extrato protéico bruto) e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das determinações das atividades enzimáticas.

A determinação do teor de proteínas solúveis total foi realizada por leitura espectrofotométrica direta, na faixa de ultravioleta, utilizando-se comprimento de onda de 280 e 260 nm (ROL, 2001).

A determinação da atividade de catalases foi realizada pelo método do desaparecimento do peróxido de hidrogênio a 240 nm (BEERS; SIZER, 1952), utilizando-se meio de reação contendo peróxido de hidrogênio ( $0,38 \text{ mol L}^{-1}$ ), em um volume final do meio de reação de 1,4 mL. A reação iniciou-se com a adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico bruto, e as leituras espectrofotométricas a 240 nm foram realizadas por dois minutos, em intervalos de 10 segundos, sendo selecionada a variação da absorbância a 240 nm na região linear de maior decréscimo (declividade). Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar para peróxido de hidrogênio a 240 nm de  $66 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (SRIVASTAVA; DWIVEDI, 2001), e a mesma foi expressa em nkat por mg de proteína solúvel total.

A determinação da atividade de peroxidases foi realizada foi pelo método da oxidação do guaiacol a tetraguaiacol a 470 nm, utilizando-se meio de reação contendo guaiacol ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $0,38 \text{ mol L}^{-1}$ ), em um volume final do meio de reação de 2,9 mL. A reação iniciou-se com a adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico bruto, e as leituras espectrofotométricas a 470 nm foram realizadas por dois minutos, em intervalos de 10 segundos, sendo selecionada a

variação da absorbância a 470 nm na região linear de maior incremento (declividade). Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar para tetraguaiacol a 470 nm de  $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (SRIVASTAVA; DWIDEDI, 2001), e a mesma foi expressa em nkat por mg de proteína solúvel total.

### **2.2.7 – Delineamento experimental e análises estatísticas**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para ambos os ensaios. As variáveis foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, pelo programa SASM-AGRI® (CANTERI et al., 2001).

O cálculo da porcentagem de controle da doença foi realizado a partir da AACPD, considerando a testemunha como 0% de controle.

O efeito relativo de cada um dos tratamentos quanto à atividade enzimática foi calculado estipulando-se o valor de 1,00 para o tratamento testemunha (atividade relativa em relação à testemunha) ou para o tempo zero (atividade relativa ao tempo zero).

## 2.3 – Resultados e Discussão

Inicialmente, todos os tratamentos bacterianos resultaram em redução efetiva da severidade da mancha parda no primeiro ensaio (Fig. 1A). Embora a severidade da doença tenha aumentado ao longo das avaliações nas plantas testemunha, o comportamento biocontrolador foi mantido pela maioria dos tratamentos, exceto pela rizobactéria DFs306 (Fig. 1B, 1C). Por outro lado, o tratamento químico (T+F) que inicialmente não foi eficiente, permitiu um progresso mais lento da doença, o que resultou em comportamento distinto da testemunha nas segunda e terceira avaliações (Fig. 1B, 1C).

Ao analisar o efeito acumulativo da mancha parda (AACPD) no primeiro ensaio, verificou-se que o controle propiciado pelos tratamentos bacterianos variou entre 31% e 68% (Fig. 1D). De modo geral, a eficiência das rizobactérias utilizadas individualmente e em combinação não diferiram uma da outra, exceto pela bactéria DFs306.

No primeiro ensaio, nenhum tratamento foi capaz de propiciar maior produção de grãos ou grãos com menor intensidade de manchas, quando comparados à testemunha (Fig. 2A, 2C, 2D, 2F). A combinação DFs185/306/416 e as rizobactérias DFs185 e DFs416 foram capazes de reduzir a massa seca de grãos chochos (Fig. 2E), porém os dois primeiros tratamentos apresentaram menor número de grãos cheios (Fig. 2B). No entanto, estas diferenças não foram suficientes para resultar em diferenças significativas na massa de grãos cheios.

A severidade da mancha parda nas plantas testemunha foi intensificada ao longo do segundo ensaio, bem como as diferenças observadas entre os tratamentos e a testemunha ou o controle químico (Fig. 3). Sete dias após da inoculação quatro tratamentos (duas rizobactérias e duas combinações) proporcionaram redução da severidade da doença (Fig. 3A). Na avaliação seguinte, todos os tratamentos bacterianos distinguiram-se da testemunha, dividindo-se em dois grupos de

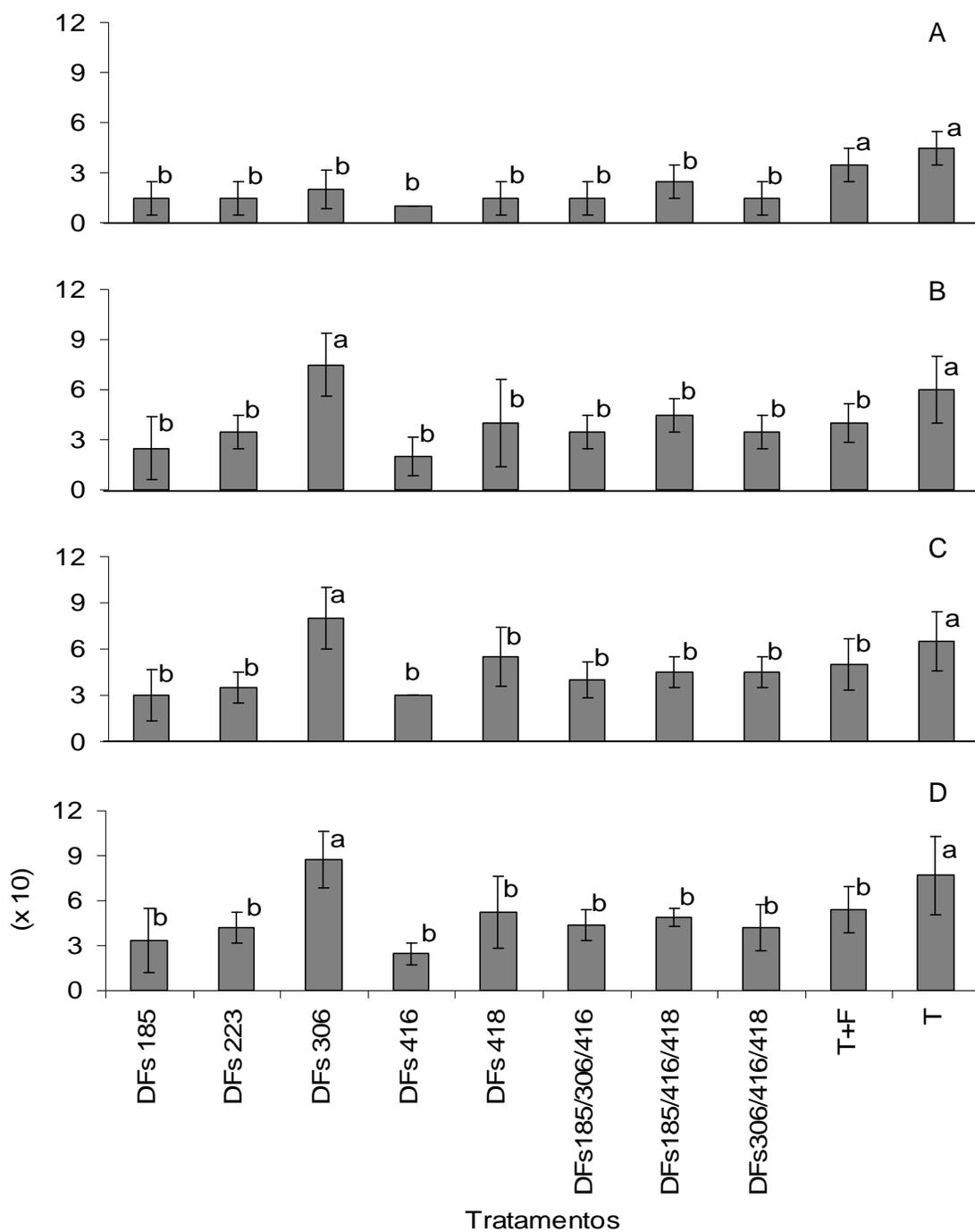


Figura 1 - Severidade da mancha parda e respectivo desvio padrão aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias (C) após a inoculação de *Bipolaris oryzae*, e área abaixo a curva de progresso da doença (AACPD) (D) em plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com rizobactérias e combinações destas, conduzidas em casa de vegetação no primeiro ensaio. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. T+F – Testemunha com fungicida; T – Testemunha com salina. Barras indicam desvio padrão.

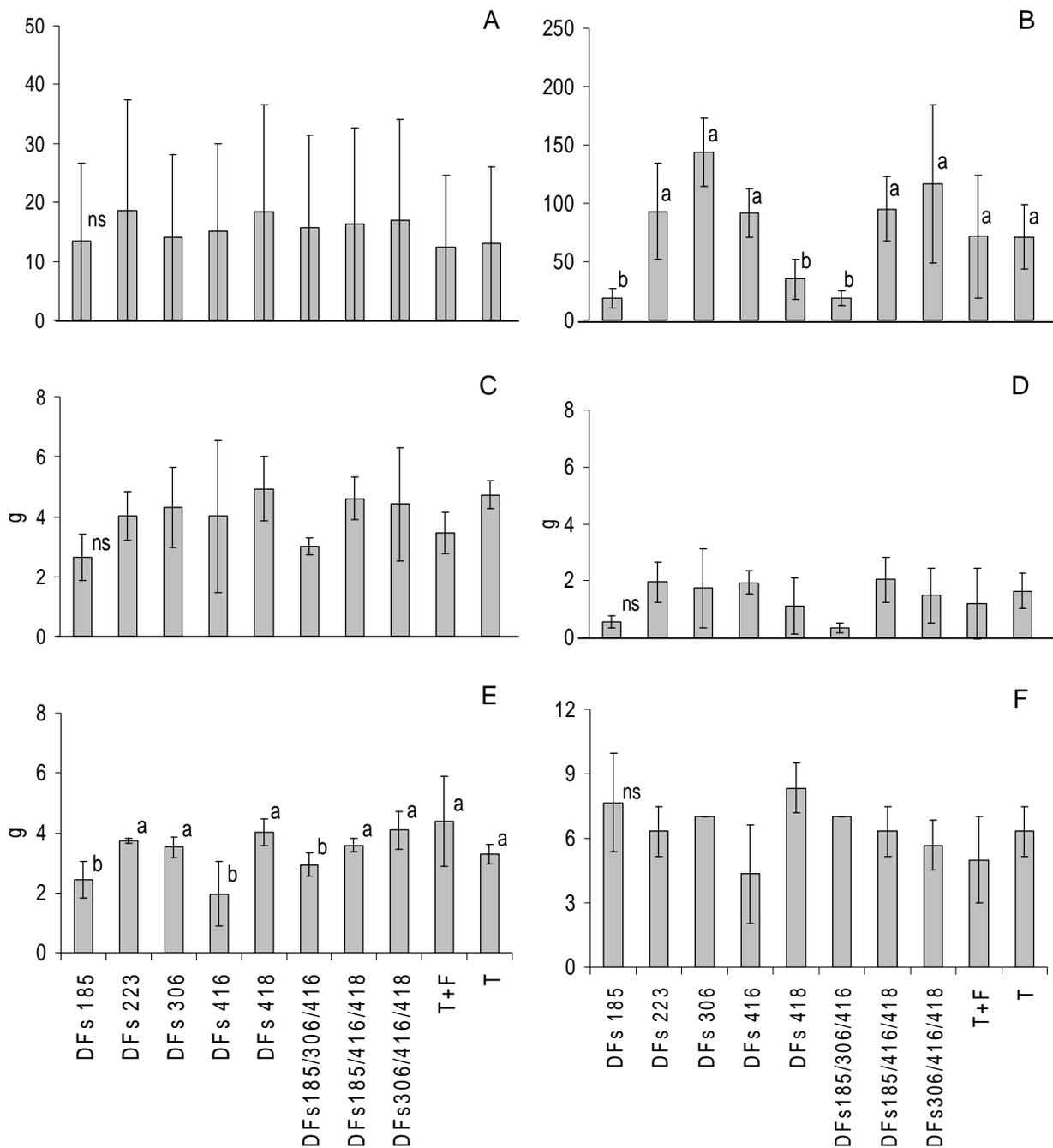


Figura 2 – Número de panículas (A), Número de grãos cheios (B), Massa seca de grãos (C), Massa seca de grãos cheios (D), Massa seca de grãos chochos (E), Severidade de mancha em grãos (F) provenientes de plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com diferentes rizobactérias e combinações destas, inoculadas com *Bipolaris oryzae*, conduzidas em casa de vegetação. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. T+F – Testemunha com fungicida; T – Testemunha com salina. Barras indicam desvio padrão. <sup>ns</sup> – valores não significativos pelo teste de médias Scott Knott ao nível de 5%.

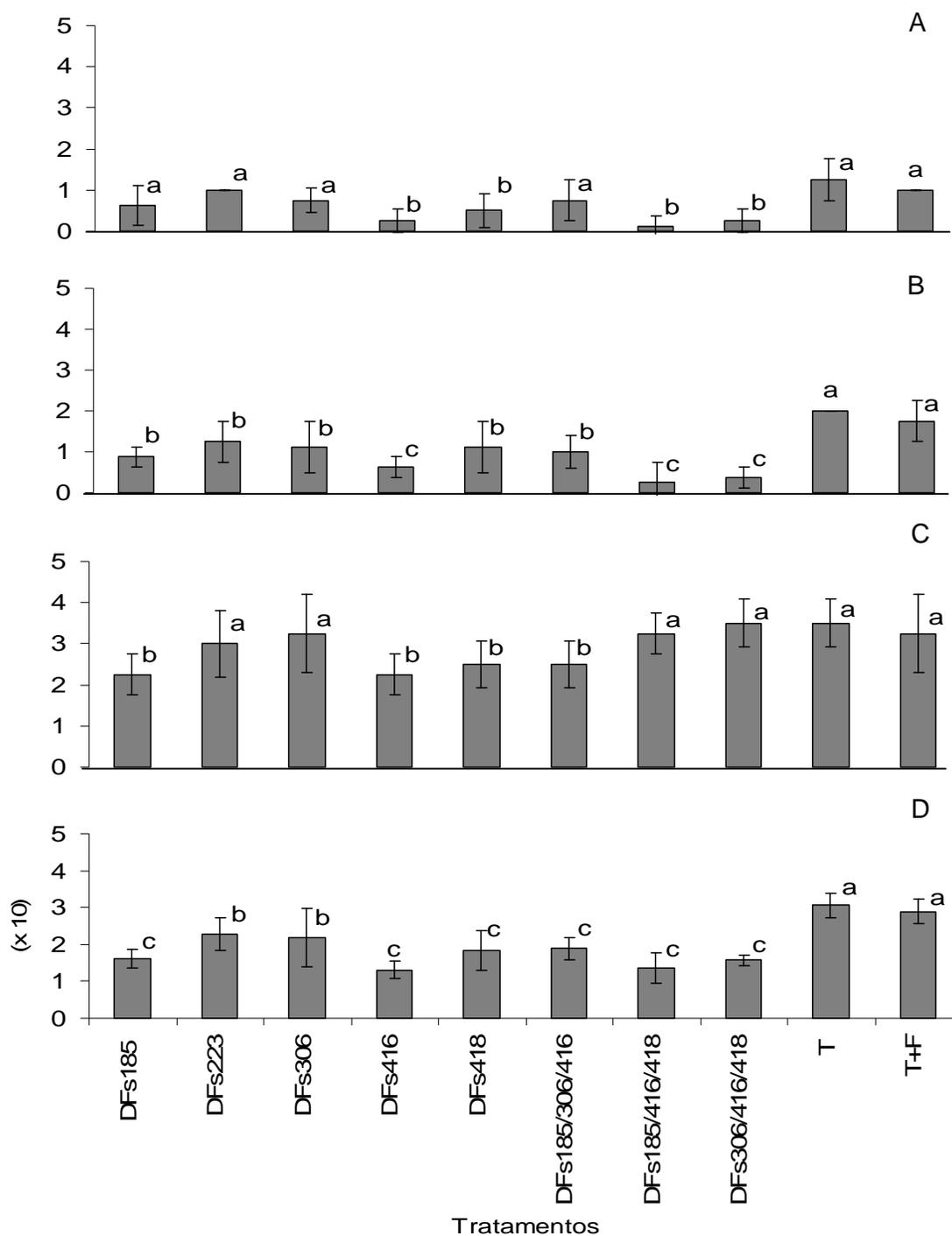


Figura 3 - Severidade da mancha parda e respectivo desvio padrão aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias (C) após a inoculação de *Bipolaris oryzae*, e área abaixo a curva de progresso da doença (AACPD) (D) em plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com rizobactérias e combinações destas, conduzidas em casa de vegetação no segundo ensaio. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. T+F – Testemunha com fungicida; T – Testemunha com salina. Barras indicam desvio padrão.

eficiência: maior (letra c) e intermediária (letra b) (Fig. 3B). Embora nos sete dias seguintes (21 dias) o comportamento biocontrolador tenha perdido a intensidade, resultando em menor número de tratamentos efetivos (Fig. 3C), seu efeito acumulativo (AACPD) foi acentuado (Fig. 3D), proporcionando redução de severidade entre 27 e 58%. Sob este aspecto, todas as combinações situaram-se no grupo mais eficiente (letra c), enquanto dentre as rizobactérias usadas de forma individual, DFs223 e DFs306, formaram um grupo intermediário (letra b).

De modo geral, observou-se um padrão de comportamento para a atividade específica das enzimas avaliadas (Fig. 4A, 4D e 5A, 5D). Houve aumento após 24 horas da inoculação seguido de queda em níveis inferiores ao inicial, a exceção das rizobactérias utilizadas individualmente para atividade de peroxidases, onde ocorreu somente redução ao longo do período estudado. Há que se destacar que nenhum dos tratamentos proporcionou valores superiores à testemunha nos dois primeiros momentos avaliados, para ambas as enzimas, exceto a rizobactéria DFs185.

De forma generalizada, as atividades relativas para catalases e peroxidases apresentaram padrões opostos, isto é, enquanto que para uma enzima foi crescente, para outra enzima, decrescente. A atividade relativa de catalases em relação à testemunha foi crescente para a maioria dos tratamentos bacterianos, exceto para as combinações DFs185/416/418 e DFs306/416/418, para as quais ocorreu redução após 24 horas (Fig. 4B, 4E). Por outro lado, a atividade relativa de catalases em relação ao tempo 0h foi crescente até 24 horas e depois descendente para todos os tratamentos, exceto para a rizobactéria DFs185 onde esta atividade foi somente decrescente (Fig. 4C, 4F).

A atividade relativa de peroxidases em relação à testemunha foi decrescente para a maioria dos tratamentos bacterianos, exceto para a combinação DFs185/306/416 e para a rizobactéria DFs418, para as quais ocorreu aumento após 24 horas (Fig. 5B, 5E). Por outro lado, a atividade relativa de peroxidases em relação ao tempo 0h foi decrescente para a maioria dos tratamentos, exceto para a testemunha e combinação DFs185/306/416 onde esta atividade foi inicialmente crescente (Fig. 5C, 5F).

Foi possível associar a participação das enzimas avaliadas ao controle proporcionado por alguns tratamentos. A combinação DFs185/306/416 permitiu intenso aumento em relação à testemunha para ambas as enzimas. Este comportamento foi parcialmente similar em atividade em relação ao tempo, isto é,

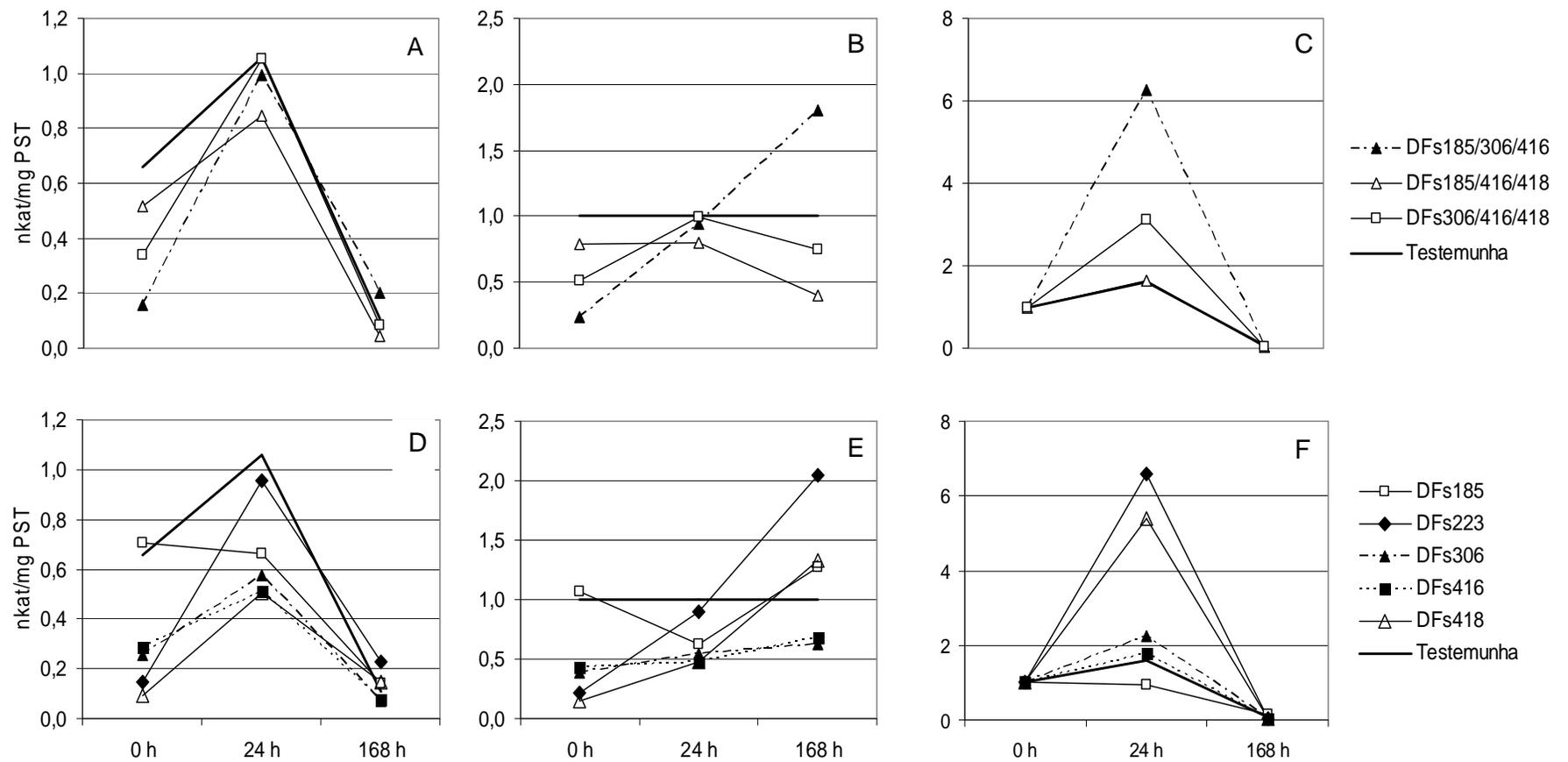


Figura 4 - Atividade específica (A e D), atividade relativa à testemunha (B e E) e atividade relativa ao tempo 0h (C e F) das catalases, em folhas de arroz, provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias, coletadas após 0, 24 e 168h após a inoculação de *Bipolaris oryzae*. PST – Proteínas solúveis totais.

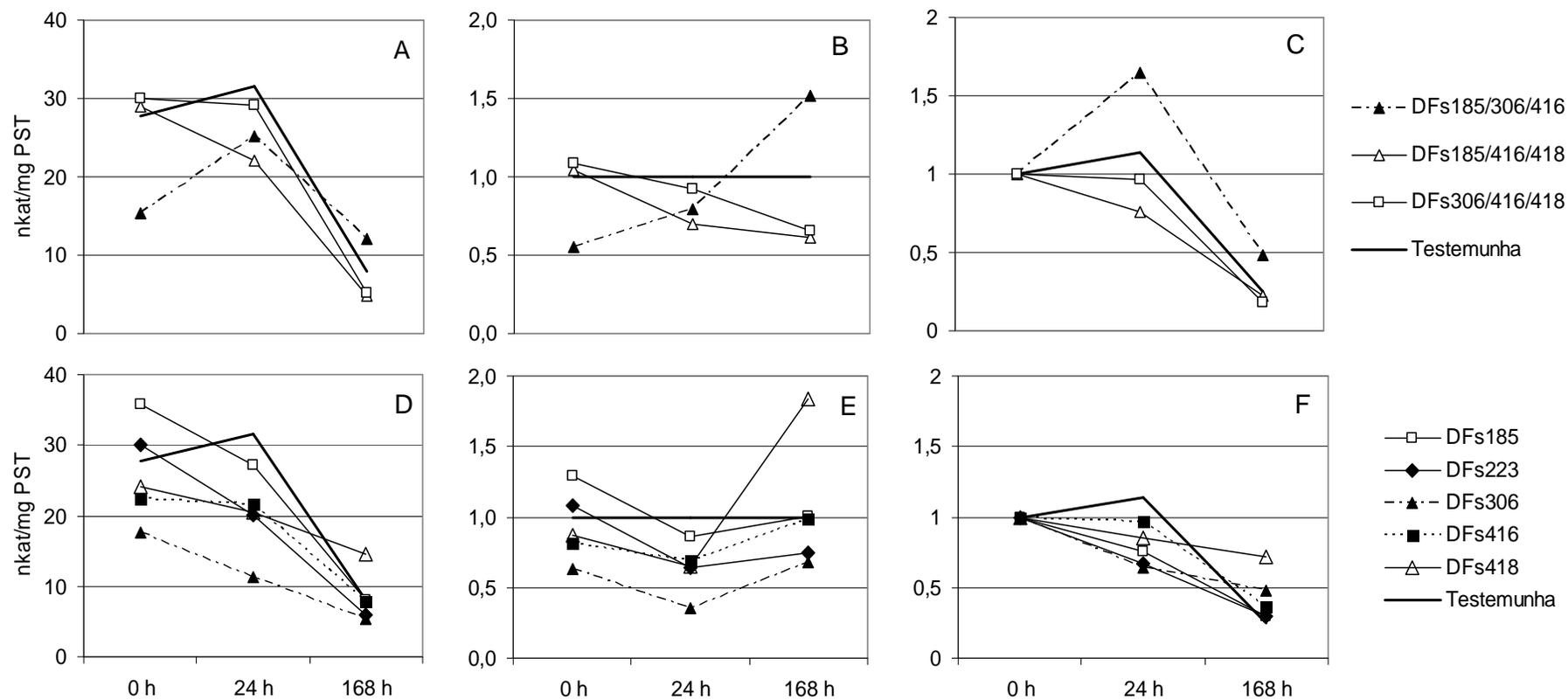


Figura 5 - Atividade específica (A e D), atividade relativa à testemunha (B e E) e atividade relativa ao tempo 0h (C e F) das peroxidases, em folhas de arroz, provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias, coletadas após 0, 24 e 168h após a inoculação de *Bipolaris oryzae*. PST – Proteínas solúveis totais.

intenso aumento nas primeiras 24 horas e posterior decréscimo até ou próximo do nível apresentado pelas plantas testemunha.

O controle proporcionado por outros tratamentos puderam ser associados a alterações nas atividades de uma ou outra das enzimas estudadas. O uso da combinação DFs306/416/418 ou das rizobactérias DFs223 ou DFs418 resultou em aumento relativo da atividade de catalases após 24 horas; enquanto que a rizobactéria DFs418 propiciou intenso aumento da atividade de peroxidases em relação à atividade nas plantas testemunha. Os demais tratamentos resultaram em comportamento similar à testemunha.

Os níveis de controle da mancha parda observados no presente trabalho não diferem muito dos observados por outros autores para as mesmas rizobactérias avaliadas individualmente (LUDWIG et al., 2009; LUDWIG, 2009) ou em combinação (SOUZA JÚNIOR, 2010). Entretanto, nos estudos utilizando estas rizobactérias isoladamente, a eficiência de controle foi variada, tanto na intensidade (máximo variou de 53 a 87%) quanto em relação a quais bactérias foram significativamente eficientes.

O controle instável proporcionado pela rizobactéria DFs306 não é raro quando biocontroladores são utilizados de forma individual, o que ocasiona problemas de instabilidade como foi relatado por Ludwig; Moura (2009). A combinação de biocontroladores individualmente eficientes é uma das estratégias estudadas para reduzir este aspecto indesejável, sendo relatado para combinações entre bactérias e fungos (MAKETON; APISITSANTIKUL; SIRIRAWEEKUL; 2008), bem como entre diferentes bactérias (RAUPACH; KLOEPFER, 1998). Os resultados obtidos no presente trabalho seguem esta premissa e são corroborados por aqueles obtidos por Souza Júnior (2010) utilizando os mesmos tratamentos.

A estabilidade propiciada pelas combinações de biocontroladores geralmente é baseada no fato destes possuírem individualmente diferentes mecanismos de ação (GUETSKY et al., 2001). Esta é uma possibilidade para explicar os resultados aqui obtidos, uma vez que dentre as bactérias utilizadas neste trabalho estão espécies de *Pseudomonas* (DFs185 e DFs223) e de *Bacillus* (DFs416 e DFs418). Espécies de ambos os gêneros são conhecidos como produtores de antibióticos, sideróforos e enzimas líticas envolvidas no controle biológico de doenças (O'SULLIVAN; O'GARA, 1992; BANO; MUSARRAT, 2003) e indutores de resistência (CHOUDHARY; JOHRI, 2009).

O controle da mancha parda, aqui observado, não foi capaz de resultar em maior produção de grãos. Este comportamento pode ser atribuído ao custo metabólico da planta utilizado pelos mecanismos associados ao controle biológico por indução de resistência, sendo que a planta gasta grande parte da sua energia nestes mecanismos (HEIL, 2001). Adicionalmente, a maturação dos grãos coincidiu com o início da época de frio, devido ao semeio tardio, o que explica o alto percentual de grãos chochos em todos os tratamentos (65 a 97%). Há que se ressaltar que os resultados de produção encontrados neste trabalho diferem daqueles observados quando utilizadas as mesmas bactérias isoladamente, resultando aumentos significativos na massa de grãos (LUDWIG et al., 2009; LUDWIG, 2009).

De modo geral, a atividade específica das enzimas avaliadas seguiu a premissa de que estas enzimas são formadas rapidamente após a infecção pelo patógeno (BAKER; ORLANDI, 1995), sendo relatados níveis máximos 24 horas após o início da infecção (PODILE; LAXMI, 1998). A redução da severidade da doença proporcionada por isolados biocontroladores, pode estar intimamente relacionada a aumentos na atividade de enzimas após as plantas serem inoculadas (SILVA et al., 2004), ou seja, esses mecanismos podem ser acionados e/ou intensificados a partir do desafio com o patógeno, que produzirá substâncias tóxicas às células do hospedeiro e que por sua vez, será reduzida pela produção destas enzimas consideradas detoxificadoras.

É possível aventar que seja este o mecanismo de defesa que determinou, pelo menos em parte, o nível de controle da mancha-parda para as combinações DFs185/306/416 e DFs306/416/418 e para as rizobactérias DFs223e DFs418 uma vez que para estes tratamentos foram observados intenso aumento de atividade após a inoculação associados à redução da doença. Comportamento similar foi mostrado por Nandakumar et al. (2001) que observaram aumentos na atividade de peroxidases após a inoculação, os quais foram associados à redução na severidade da queima das bainhas em plantas de arroz microbiolizadas com *P. fluorescens*. Aumento de atividade destas enzimas ao longo do período avaliado, independentemente da inoculação de algum patógeno, também já foi associado à indução de resistência em arroz elicitado por metabólitos da fermentação de actinomicetos (769) (LI et al., 2009)

Não se pode descartar a participação da indução de resistência nos demais tratamentos bacterianos uma vez que inúmeras outras proteínas relacionadas à patogênese (PIETERSE et al., 2005) não foram avaliadas no presente trabalho. Dentre estas, já foram associadas à indução de resistência em arroz: fenilalanina amônia-liases (VIDHYASEKARAN et al., 2001), quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (BABU et al., 2003; SIBLE et al., 2004), superóxido dismutase (SONG et al., 2006).

Finalmente, há que considerar que o controle biológico além de reduzir a intensidade e/ou incidência de doenças no cultivo em que é aplicado, pode exercer efeito a longo prazo quando reduz a sobrevivência dos patógenos em solo ou restos culturais, pode ser utilizado no manejo integrado e reduz custos ambientais e econômicos. Adicionalmente, o uso de combinações de biocontroladores geralmente reduz a instabilidade de efeito biocontrolador bem como pode ter efeito sobre outros patógenos.

## **2.4 - Conclusão**

Os tratamentos bacterianos, individuais e em combinação possuem potencial para controlar a mancha parda.

As rizobactérias, tanto isoladas quanto combinadas, possuem capacidade para induzir resistência pela alteração da atividade de catalases e peroxidases.

## 3 – Capítulo 2

### Indução de resistência pelo uso de bactérias isoladas e em combinação contra a escaldadura do arroz

#### 3.1 – Introdução

Escaldadura, doença que vem crescendo em importância, tem como agente etiológico o fungo *Gerlachia oryzae* (Hashioka & Yokogi) W. Gams [(teleomorfo: *Monographella albescens* (Thumen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth) (sinonimia: *Rhynchosporium oryzae*, *Microdochium oryzae*)]. Em plântulas, causa podridão das radículas e dos coleótilos (WEBSTER; GRUNNEL, 1992). A doença afeta também folhas, bainhas, colmo, panículas e grãos (PRABHU; FILIPPI, 1997). Os sintomas nas folhas iniciam pelo ápice na forma de manchas de coloração verde oliva e sem bordos definidos, exibindo uma alternância de faixas concêntricas, que vão adquirindo uma coloração marrom à medida que a lesão vai se desenvolvendo (BEDENDO; PRABHU, 2005).

Uma das principais medidas para o controle desta doença é o uso de agrotóxicos (PARISI; MALAVOLTA; LEONEL JUNIOR, 2001). Entretanto, o uso intenso destes produtos resulta em poluição do ambiente, surgimento de populações resistentes e presença de resíduos nos grãos, além de elevar os custos de produção. Outra forma freqüente de controle é o emprego de cultivares resistentes, pois são eficientes, além de apresentar baixo impacto ambiental. No entanto, a alta variabilidade genética do patógeno dificulta o desenvolvimento de novas cultivares e reduz a vida útil destas (BONMAN; MACKILL; GLASZMANN, 1990).

Devido aos aspectos negativos associados ao uso do controle químico e dificuldade de obtenção e manutenção de cultivares resistentes, pesquisas têm se

voltado para o uso de microrganismos (LUDWIG et al., 2009; SOUZA JÚNIOR, 2010), de extratos vegetais (HARISH et al., 2008) e de silício (RODRIGUES; DATNOFF, 2005) visando ao controle de doenças do arroz.

A maioria dos relatos sobre biocontrole em arroz irrigado refere-se ao uso de espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, para o controle da brusone (KRISHNAMURTHY; GNANAMANIACKAM, 1998; DONG-WON et al., 2000; KAVITHA et al., 2005), e da queima das bainhas (NANDAKUMAR et al., 2001; KAZEMPOUR, 2004; WIWATTANAPATAPEE et al., 2004). Embora estudos sobre o controle biológico da escaaldadura ainda sejam escassos, resultados promissores foram obtidos por Ludwig et al. (2009), Ludwig (2009) e Souza Júnior (2010).

É sabido que o biocontrole pode se apresentar instável no que diz respeito a diferentes condições de clima, de microbiota presente no solo ou no filoplano, de população do patógeno, de cultivar utilizada e de manejo. O uso de combinações de rizobactérias individualmente eficientes e que atuem por diferentes mecanismos de ação geralmente minimizam instabilidade (LUDWIG; MOURA, 2009).

A proteção da planta hospedeira, proporcionado por um agente de biocontrole, pode se dar de forma direta, pela competição por nutrientes (WELLER, 1988), pela antibiose (THOMASHOW et al., 1990), ou parasitismo (WHIPPS, 2001) e de forma indireta, pela indução de resistência (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). A resistência induzida ocorre pela ativação de genes que codificam diferentes respostas de defesa, que incluem enzimas que catalisam a formação de lignina e compostos fenólicos (fenilalanina-amônia-liase); que destroem formas ativas de oxigênio produzidas pelos patógenos (catalases e peroxidases) (BUCHANAN; BALMER, 2005), além daquelas que atuam diretamente nos patógenos (quitinases,  $\beta$ -1,3- glucanases) (STICHER; MAUC-MANI; METRAUX, 1997).

Este trabalho teve como objetivo, utilizar rizobactérias isoladas e em combinação no controle da escaaldadura do arroz, frente ao seu impacto sobre a produção de grãos, e o envolvimento da indução de resistência associado à atividade de catalases e peroxidases.

### 3.2 – Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casa de vegetação não climatizada, no Departamento de Fitossanidade, e no Laboratório de Metabolismo Vegetal do Instituto de Biologia, pertencentes à Universidade Federal de Pelotas.

#### 3.2.1 – Isolados utilizados e sua manutenção

Os isolados bacterianos utilizados (Tab. 2) fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, os quais foram selecionados por Ludwig et al. (2009) e suas combinações por Souza Júnior (2010).

Tabela 2 – Identificação e habitat dos isolados bacterianos utilizados para microbiolizar sementes de arroz

<b>Isolados</b>	<b>Identificação*</b>	<b>Habitat</b>
DFs185	<i>Pseudomonas synxantha</i> (Ehrenberg) Holand	Semente de arroz
DFs223	<i>P. fluorescens</i> Migula	Semente de arroz
DFs306	Não identificado	Semente de cebola
DFs416	<i>Bacillus</i> sp. Cohn	Contaminante indicador de antibiose
DFs418	<i>Bacillus</i> sp. Cohn	Contaminante indicador de antibiose

\*Determinados por sequenciamento do gene 16S DNA (dados não publicados)

O isolado de *G. oryzae* foi obtido de sementes de arroz naturalmente infestadas produzidas no município de Pelotas.

As culturas estão sendo mantidas sob refrigeração em meio sólido em tubos com tampa rosqueável e/ou em água destilada estéril sob condições ambiente e/ou em freezer emulsificadas em glicerina (ROMEIRO, 2001).

### 3.2.2 – Preparo das suspensões e microbiolização das sementes

As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de cada um dos isolados, com 24 horas de crescimento em meio 523 de Kado; Heskett (1970). Os cultivos foram suspensos em solução salina (NaCl 0,85%) e a concentração foi ajustada para  $A_{540}=0,5$  em espectrofotômetro. As combinações foram obtidas a partir de suspensões dos isolados preparadas individualmente e com as concentrações ajustadas, misturadas em volumes iguais.

Sementes de arroz da cultivar El Paso 144L foram imersas, sob agitação, durante 30 minutos, à 10°C, nas suspensões bacterianas. Como testemunha, sementes foram imersas somente em solução salina, ou em salina mais o fungicida Vitavax Thiram® 200SC (Carboxin + Thiram) (T+F), na concentração correspondente a 3mL Kg<sup>-1</sup> de sementes, segundo indicação de Embrapa (2005), para o controle das principais doenças fúngicas do arroz veiculadas pelas sementes.

Os tratamentos utilizados foram: DFs185, DFs223, DFs306, DFs416, DFs418, DFs185+DFs416, DFs185+DFs418, DFs185+DFs306+DFs416, testemunha + fungicida e testemunha.

### 3.2.3 – Plantio e condução dos ensaios

Os ensaios foram conduzidos em diferentes anos, sendo o primeiro realizado em vasos de 7 Kg e o segundo, em vasos de 1 Kg de solo não esterilizado e do tipo Planossolo. O teor de macronutrientes foi corrigido segundo Comissão..., (2004) (ANEXO A). Foram depositadas seis sementes por vaso. Para ambos os ensaios, após emissão da segunda folha (estádio V2) (COUNCE; KEISLING; MITCHELL, 2000), realizou-se o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Para o primeiro ensaio, a inundação ocorreu quando as plantas encontravam-se no estágio V6 de desenvolvimento e, para o segundo ensaio, não foi necessário realizar esta prática, uma vez que a avaliação ocorreu no estágio V4-V5.

### 3.2.4 – Inoculação

Os esporos usados foram obtidos a partir de colônias puras com 15 dias de crescimento em meio BDA (batata dextrose ágar). A suspensão de esporos foi pulverizada nas plantas de arroz, numa concentração de 10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. As plantas foram mantidas em câmara úmida, 24 antes e 48 horas após a inoculação.

As plantas no primeiro ensaio encontravam-se no estágio V6, enquanto que no segundo ensaio, no estágio V4 (COUNCE; KEISLING; MITCHELL, 2000).

### **3.2.5 – Avaliações**

As plantas foram avaliadas quanto à severidade da doença aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno, através de notas atribuídas de acordo com a severidade da doença. Para ambos os ensaios, utilizou-se escala desenvolvida por IRRI (1996), onde: 0 = sem incidência; 1 = menos de 1% da área foliar afetada (lesões apicais); 3 = entre 1 e 5% (lesões apicais); 5 = entre 6 e 25% (lesões apicais e marginais); 7 = entre 26 e 50% (lesões apicais e marginais) e, 9 = entre 51 e 100% (lesões apicais e marginais). Foi calculada a Área Abaixo a Curva de Progresso da Doença (AACPD) a partir dos valores de severidade anotados nos três dias de avaliação utilizando-se o programa Gwbasic (MAFFIA, 1986).

As plantas no primeiro ensaio foram conduzidas até a produção quando foram contados o número de panículas e de grãos. Posteriormente os grãos foram colhidos e secos a 25°C em estufa com circulação de ar forçado, sendo estabelecidas as massas de grãos, de grãos chochos e de grãos cheios. Foram atribuídas notas de 1 a 9, em relação à porcentagem de grãos manchados, segundo escala diagramática desenvolvida por IRRI (1975) (ANEXO B).

### **3.2.6 – Quantificação da atividade enzimática de peroxidases e catalases**

No segundo ensaio, coletaram-se folhas em três diferentes tempos: 0 hora (imediatamente antes da inoculação do patógeno), 24 e 168 horas após a inoculação. As amostras coletadas foram armazenadas a -80°C, e posteriormente foram avaliadas quanto ao teor de proteínas solúveis (PST) e à atividade de peroxidases e catalases.

Para a obtenção do extrato enzimático bruto, aproximadamente 250 mg da folha, foram maceradas em 5 mL de tampão Tris-HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,2 contendo 0,1% de polivilpírolidona e 0,05 % de EDTA, seguida de centrifugação a 10.000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado (extrato protéico bruto) e armazenado a -80°C até o momento das determinações das atividades enzimáticas.

A determinação do teor de proteínas solúveis total foi realizada por leitura espectrofotométrica direta, na faixa de ultravioleta (UV), utilizando-se comprimento de onda de 280 e 260 nm (ROL, 2001).

A determinação da atividade de catalases foi realizada pelo método da do desaparecimento do peróxido de hidrogênio a 240 nm (BEERS; SIZER, 1952), utilizando-se meio de reação contendo peróxido de hidrogênio ( $0,38 \text{ mol L}^{-1}$ ), em um volume final do meio de reação de 1,4 mL. A reação iniciou-se com a adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico bruto, e as leituras espectrofotométricas a 240 nm foram realizadas por dois minutos, em intervalos de 10 segundos, sendo selecionada a variação da absorbância a 240 nm na região linear de maior decréscimo (declividade). Para zerar o espectrofotômetro, foi utilizada água destilada em substituição ao extrato protéico bruto. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar para peróxido de hidrogênio a 240 nm de  $66 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (SRIVASTAVA; DWIVEDI, 2001), e a mesma foi expressa em nkat por mg de proteína solúvel total.

A determinação da atividade de peroxidases foi realizada foi pelo método da oxidação do guaiacol a tetraguaiacol a 470 nm, utilizando-se meio de reação contendo guaiacol ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $0,38 \text{ mol L}^{-1}$ ), em um volume final do meio de reação de 2,9 mL. A reação iniciou-se com a adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico bruto, e as leituras espectrofotométricas a 470 nm foram realizadas por dois minutos, em intervalos de 10 segundos, sendo selecionada a variação da absorbância a 470 nm na região linear de maior incremento (declividade). Para zerar o espectrofotômetro, foi utilizada água destilada em substituição ao extrato protéico bruto. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar para tetraguaiacol a 470 nm de  $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (SRIVASTAVA; DWIDEDI, 2001), e a mesma foi expressa em nkat por mg de proteína solúvel total.

### **3.2.7 – Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os valores de AACPD e das variáveis de produção foram submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, pelo programa estatístico SASM-AGRI® (CANTERI et al., 2001).

Para o cálculo da porcentagem de controle da doença foi utilizada a severidade da doença (AACPD), considerando-se a testemunha como 0% de controle.

O efeito de cada um dos tratamentos quanto à atividade enzimática relativa foi calculado estipulando-se o valor de 1,00 para o tratamento testemunha (atividade relativa em relação à testemunha) ou para o tempo zero (atividade relativa ao tempo zero).

### 3.3 – Resultados e Discussão

No primeiro ensaio, todos os tratamentos bacterianos reduziram a severidade da escaldadura, enquanto que o controle químico foi ineficaz (Fig. 6). Embora a severidade da doença tenha aumentado ao longo das avaliações intermediárias, o biocontrole foi mantido pelas rizobactérias DFs185 e DFs223 (Fig. 6B, 6C). Por outro lado, quando se observou o efeito acumulativo (AACPD), verificou-se que todos os tratamentos bacterianos foram efetivos, proporcionando porcentagem de controle variando de 22% a 53% (Fig. 6D). Adicionalmente, as rizobactérias DFs185 e DFs223 resultaram em controle significativamente superior aos demais tratamentos, inclusive em relação às combinações.

A maioria dos tratamentos bacterianos avaliados (todas rizobactérias utilizadas individualmente e a combinação DFs185/416) resultaram em aumento de pelo menos uma variável relacionada à produção (Fig. 7). Houve redução do número de panículas (DFs185, DFs223 e DFs416) (Fig. 7A) embora ainda assim alguns tratamentos tenham resultado em produção de um maior número de grãos (Fig. 7B). Também foi observada alteração na proporção entre as massas de grãos cheios e chochos (Fig. 7D, 7E), destacando-se a rizobactéria DFs185 que além de propiciar redução da massa de grãos chochos em relação à testemunha, aumentou a de grãos cheios. Adicionalmente, nenhum tratamento foi capaz de produzir grãos com menor intensidade de manchas (Fig. 7F).

Foi possível verificar que nas duas primeiras avaliações do segundo ensaio, todos os tratamentos bacterianos reduziram a severidade da doença, exceto a rizobactéria DFs418, que se mostrou igual à testemunha e ao tratamento químico (Fig. 8A, 8B). Entretanto, após 21 dias, todos os tratamentos reduziram a severidade da doença (Fig. 8C). Este comportamento se repetiu em relação ao efeito acumulativo (AACPD), porém distinguindo dois grupos com eficiência de controle

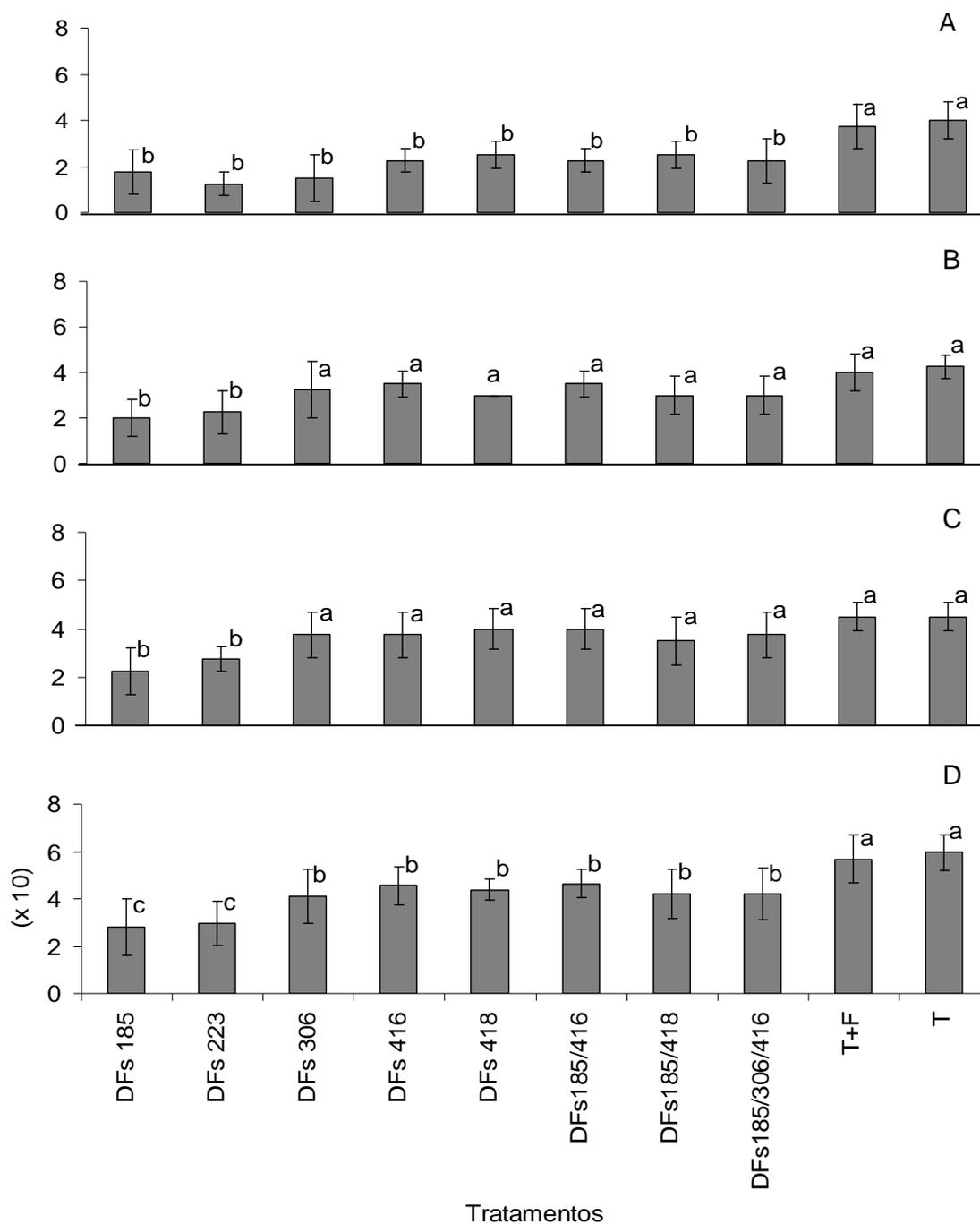


Figura 6 - Severidade da escaldadura e respectivo desvio padrão aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias (C) após a inoculação de *Gerlachia oryzae*, e área abaixo a curva de progresso da doença (AACPD) (D) em plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com rizobactérias e combinações destas, conduzidas em casa de vegetação no primeiro ensaio. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. T+F – Testemunha com fungicida; T – Testemunha com salina. Barras indicam desvio padrão.

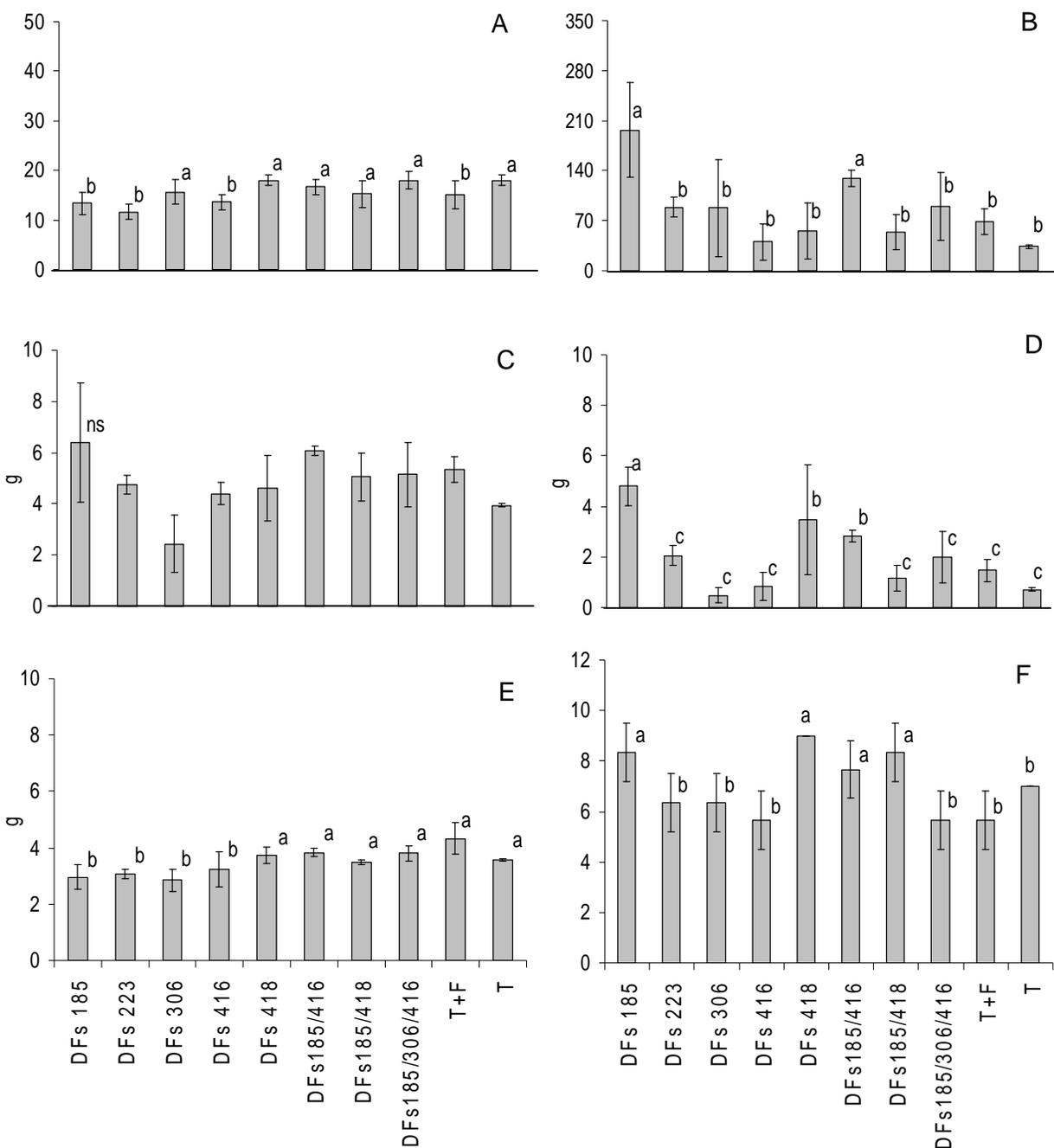


Figura 7 – Número de panículas (A), Número de grãos cheios (B), Massa seca de grãos (C), Massa seca de grãos cheios (D), Massa seca de grãos chochos (E), Severidade de mancha em grãos (F) provenientes de plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com diferentes rizobactérias e combinações destas, inoculadas com *Gerlachia oryzae*, conduzidas em casa de vegetação. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. T+F – Testemunha com fungicida; T – Testemunha com salina. Barras indicam desvio padrão. <sup>ns</sup> – valores não significativos pelo teste de médias Scott Knott ao nível de 5%.

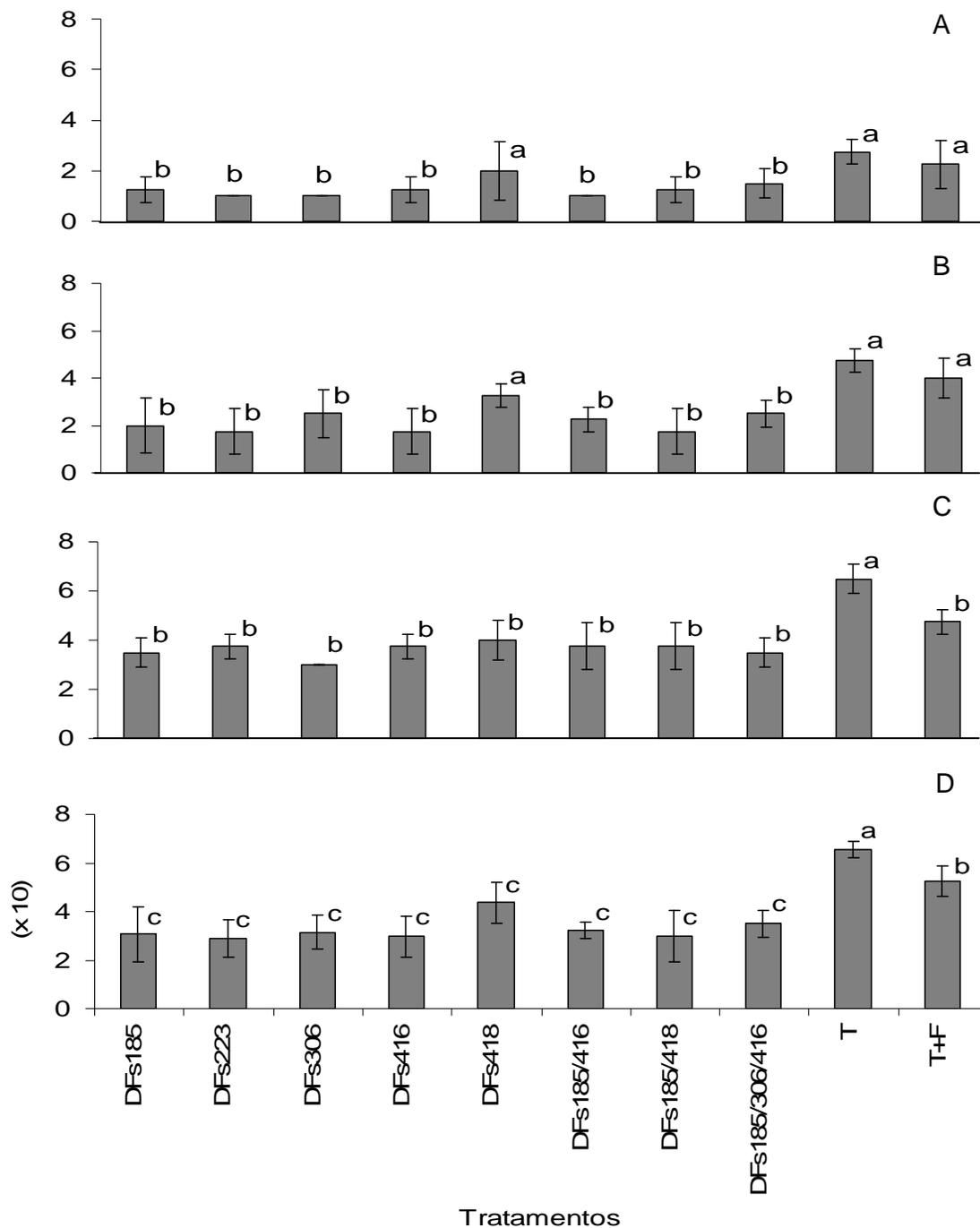


Figura 8 - Severidade da escaldadura e respectivo desvio padrão aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias (C) após a inoculação de *Gerlachia oryzae*, e área abaixo a curva de progresso da doença (AACPD) (D) em plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com rizobactérias e combinações destas, conduzidas em casa de vegetação no segundo ensaio. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. T+F – Testemunha com fungicida; T – Testemunha com salina. Barras indicam desvio padrão.

significativamente distintos: um formado pelos tratamentos bacterianos (controle entre 33 e 56%) (letra c) e outro, pelo tratamento químico (20% de controle) (letra b) (Fig. 8D).

A rizobactéria DFs416 e a combinação DFs185/418 foram os únicos tratamentos a resultar em atividade específica superior à testemunha para ambas as enzimas avaliadas (Fig. 9A, 9D, 10A, 10D), embora para a combinação este comportamento tenha ocorrido apenas na avaliação após 24 horas.

Quando se compara a atividade enzimática tomando como referência a atividade nas plantas testemunha, observou aumento transiente (24 horas), para ambas as enzimas, proporcionado pela combinação DFs185/418 e a rizobactéria DFs416, e em menor intensidade, por DFs185/416 (Fig. 9B, 9E, 10B, 10E).

Por outro lado, quando a comparação é em relação ao tempo 0h, o comportamento para atividade de peroxidases foi transiente para a combinação DFs185/418 (Fig. 10C) e crescente para a rizobactéria DFs418 (Fig. 10F), Adicionalmente, observou-se atividade intensamente crescente em ambas as enzimas para a rizobactéria DFs185 (Fig 9C, 9F, 10C, 10F).

Foi possível associar, pelo menos em parte, o aumento da atividade de catalases e peroxidases ao biocontrole proporcionado pelas rizobactérias DFs185 e DFs416 e pelas combinações DFs185/418 e DFs185/416.

As rizobactérias utilizadas neste trabalho foram capazes de controlar a escaldadura em ambos os ensaios, em níveis similares àqueles obtidos por Ludwig et al., (2009), Ludwig (2009) e Souza Júnior (2010). Os resultados observados pelos dois primeiros autores mostraram a instabilidade de efeitos de algumas rizobactérias (DFs223, DFs416 e DFs418), comportamento parcialmente contraditório com o observado no presente trabalho, onde DFs223 resultou em controle estável.

Por outro lado, não foi possível, no presente trabalho, observar efeito adicional do uso de combinações de rizobactérias para o controle da escaldadura. Este resultado encontra respaldo naqueles obtidos por Souza Júnior (2010), mostrando não haver, neste caso, efeito sinérgico proporcionado pela combinação de bactérias.

Maior controle e produção podem ser alcançados pela combinação não só de biocontroladores, mas também de formas de aplicação, uma vez que, tanto a população presente no solo quanto na parte aérea podem participar do controle

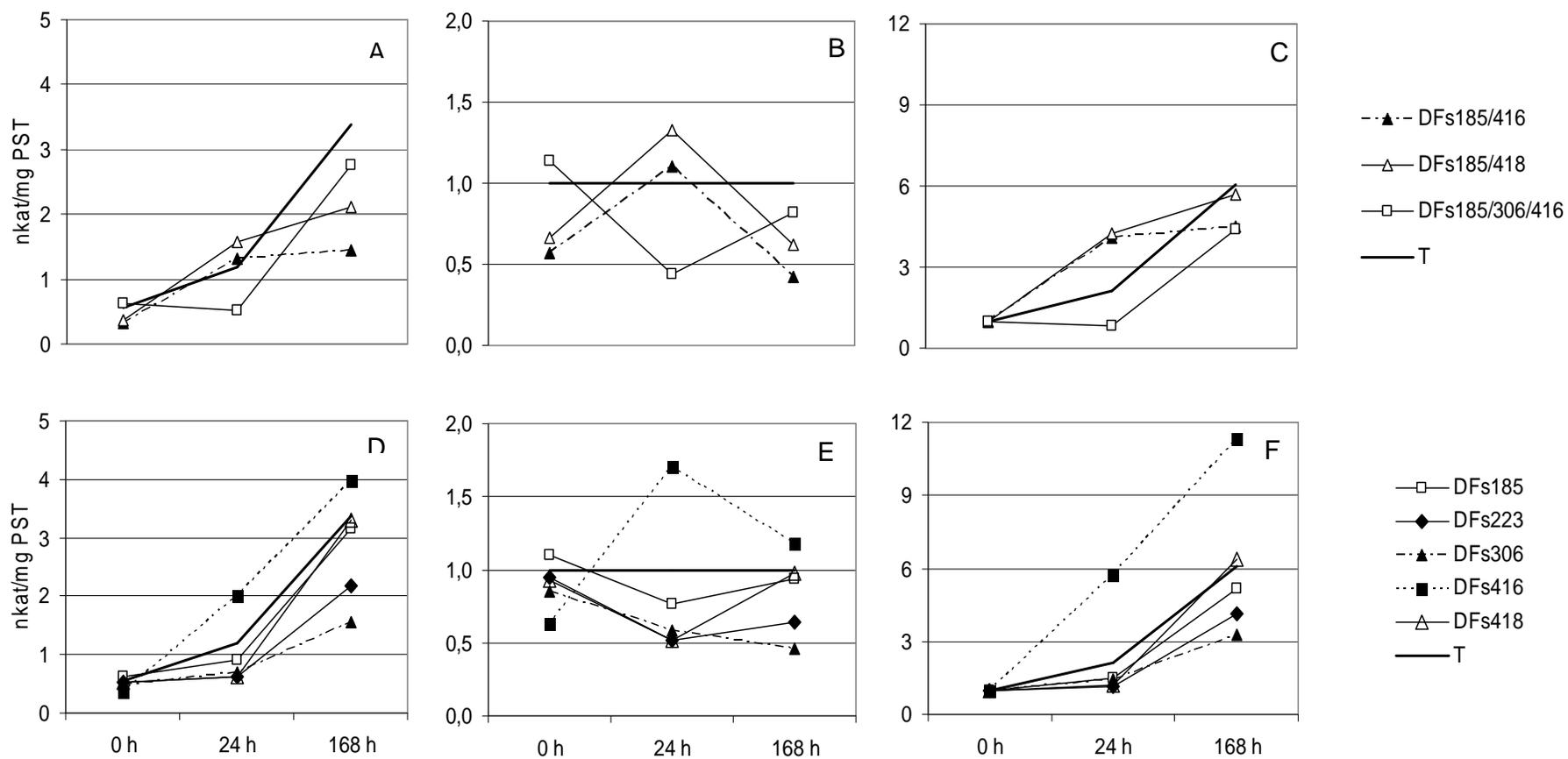


Figura 9 - Atividade específica (A e D), atividade relativa à testemunha (B e E) e atividade relativa ao tempo 0h (C e F) das catalases, em folhas de arroz, provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias, coletadas após 0, 24 e 168h após a inoculação de *Gerlachia oryzae*. PST – Proteínas solúveis totais.

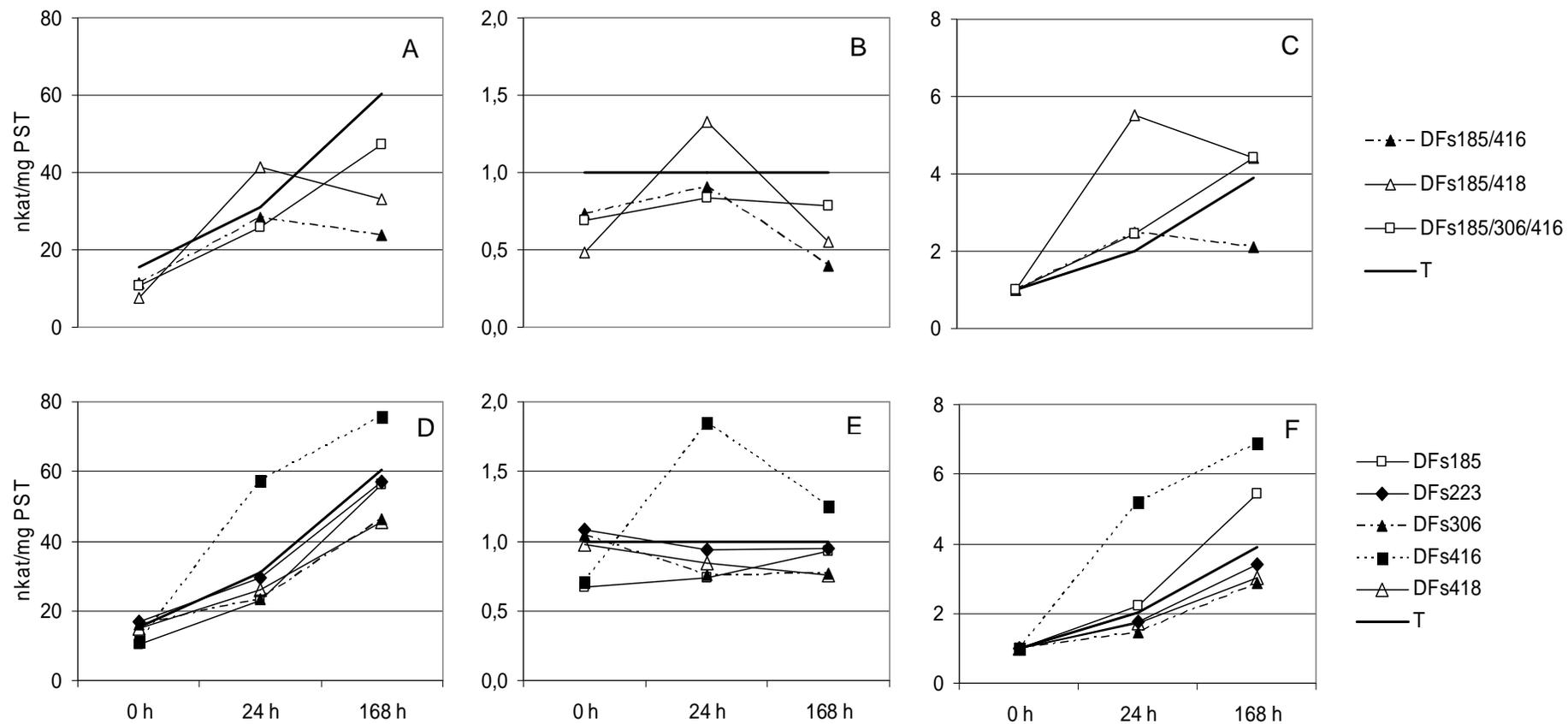


Figura 10 - Atividade específica (A e D), atividade relativa à testemunha (B e E) e atividade relativa ao tempo 0h (C e F) das peroxidases, em folhas de arroz, provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias, coletadas após 0, 24 e 168h após a inoculação de *Gerlachia oryzae*. PST – Proteínas solúveis totais.

(RABINDRAN; VIDHYASEKARAN, 1996). Esta estratégia já foi explorada no cultivo do arroz e apresentou resultados satisfatórios para o controle da queima das bainhas (THARA; GNANAMANICKAM, 1994; RABINDRAN; VIDHYASEKARAN, 1996; NANDAKUMAR et al., 2001; COMMARE et al., 2002).

Embora não se tenha alcançado maior controle da escaldadura, as combinações utilizadas neste trabalho apresentam um amplo espectro de ação dentre as doenças incidentes no arroz: queima das bainhas e nematóide das galhas (SOUZA JÚNIOR et al., 2010), e manchas foliares (SOUZA JÚNIOR, 2010). A ampliação do espectro de ação geralmente é baseada no fato de que cada biocontrolador, integrante da combinação, possui individualmente diferentes mecanismos de ação (GUETSKY et al., 2001). Isto provavelmente explica os resultados encontrados neste trabalho, já que as bactérias utilizadas são de espécies de *Pseudomonas* (DFs185 e DFs223) e de *Bacillus* (DFs416 e DFs418). Gêneros estes conhecidos por produzirem antibióticos, sideróforos e enzimas líticas envolvidas no controle biológico de doenças (O'SULLIVAN; O'GARA, 1992; BANO; MUSARRAT, 2003) e por induzirem resistência (CHOUDHARY; JOHRI, 2009).

Sabe-se que as rizobactérias utilizadas no presente trabalho podem atuar individualmente por distintos mecanismos de ação, dentre eles: antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência (LUDWIG; MOURA, 2009). No entanto, até o momento não se conhecia a participação destes mecanismos quando estas bactérias são utilizadas em combinações. Porém, o aumento da atividade específica e das atividades relativas de catalases e peroxidases observadas no presente trabalho permite afirmar que a indução de resistência ocorreu tanto para rizobactérias individualmente (DFs185 e DFs416) quanto para as combinações DFs185/416 e DFs185/418. A participação da indução de resistência no controle de doenças proporcionado por combinações de rizobactérias aqui observada foi inicialmente relatada em 2000 por Raupach; Kloepper, porém pouco explorada posteriormente.

O biocontrole alcançado pelos tratamentos bacterianos aqui avaliados pode ser atribuído à participação não só de catalases e peroxidases, mas também de tantas outras enzimas já descritas como responsáveis pela indução de resistência. Neste sentido, em trabalhos buscando controle de doenças incidentes no arroz já foram relatadas: fenilalanina amônia-liases (VIDHYASEKARAN et al., 2001),

quitinases e  $\beta$ 1,3 glucanases (BABU et al., 2003; SIBLE et al., 2004), e superóxido dismutase (SONG et al., 2006).

Finalmente, se os resultados aqui obtidos não mostraram ganhos na intensidade de controle (efeito sinérgico), existem outros aspectos positivos não avaliados. Há que se ressaltar, dentre outras vantagens, o amplo espectro de ação das combinações avaliadas e a menor instabilidade da eficiência uma vez que em conjunto apresentam maior probabilidade de sobrevivência quando expostos a diferentes condições edafoclimáticas e de manejo.

### **3.4 – Conclusão**

Todos os tratamentos bacterianos utilizados neste trabalho possuem potencial para controlar a escaldadura.

As rizobactérias utilizadas possuem capacidade para induzir resistência pela alteração da atividade de catalases e peroxidases, quando utilizadas individualmente, bem como em combinação.

#### **4 – Conclusões**

Os tratamentos bacterianos, individualmente e combinados são potenciais biocontroladores da mancha parda e escaldadura do arroz.

As rizobactérias, utilizadas individualmente e combinadas, são capazes de induzir resistência pela alteração da atividade de enzimas, como catalases e peroxidases.

## 5 – Referências

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdam: Academic Press, 2005.
- BABU, R.M.; SAJEENA, A.; SAMUNDEESWARI, A.V.; SREEDHAR, A.; VIDHYASEKARAN, P.; REDDY, M.S. Induction of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice by treatment with acibenzolar-S-methyl. **Annual Applied Biology**, v.143, p.333-340, 2003.
- BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.299-321, 1995.
- BANO, N.; MUSARRAT, J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. **Current Microbiology**, v. 46, p.324–328, 2003.
- BEDENDO, I.P.; PRABHU, A.S. Doenças do arroz (*Oryza sativa* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. v.2. p.85-99.
- BEERS JUNIOR, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal Biology Chemistry**, n.195, p.133-140, 1952.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1991. p.1-5.
- BONMAN, J.M.; MACKILL, A.O.; GLASZMANN, J.C. Resistance to *Gerlachia oryzae* in rice. **Plant Disease**, v.74, p.306-309, 1990.
- BUCHANAN, B.B.; BALMER, Y. Redox regulation: a broadening horizon. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.187-220, 2005.
- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM - Agri : sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CELMER, A.; MADALOSSO, M.G.; DEBORTOLI, M.P.; NAVARINI, L.; BALARDIN, R.S. Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.901-904, 2007.

CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v.164, n. 5, p.493-513, 2009.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DE SOLO – RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3.ed. Pelotas: SBCS – Núcleo Regional Sul, 2004. 223p.

COMMARE, R.J.; NANDAKUMAR, R.; KANDAM, A.; SURESH, S.; BHARATHI, M.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. *Pseudomonas fluorescens* based bioformulation for the management of sheath blight disease and leaf folder insect in rice. **Crop Protection**, v.21, p.671-677, 2002.

CONAB, 2010. Disponível em [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10\\_11\\_10\\_11\\_28\\_48\\_boletim\\_portugues\\_-\\_nov\\_de\\_2010..pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_11_10_11_28_48_boletim_portugues_-_nov_de_2010..pdf). Acesso em 22 de novembro de 2010.

CORRÊA, B.O.; MOURA, A.B.; DENARDIN, N.D.; SOARES, V.N.; SCHÄFER, J.T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac. e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.156-163, 2008.

COUNCE, P.A.; KEISLING, T.C.; MITCHELL, A.J. A uniform, objective and adaptative system for expressing rice development. **Crop Science**, v.40, p.436-443, 2000.

De BOER, M.; BOM, P.; KINDT, F.; KEURENTJES, J.J.B.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. **Phytopathology**, v. 93, n.5, p.626 – 632, 2003.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 395p.

DONG-WON, B.; JOON-TAEK, L.; DAE-YOUNG, S.; LEE, E.S.; HEE-KYU, K. Isolation of bacterial strain antagonistic to *Pyricularia oryzae* and its mode of antifungal action. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p. 811-816, 2000.

DUNE, C.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; McCARTHY, J.; HIGGINS, P.; POWELL, J.; DOWLING, D. N.; O'GARA, F.. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. **Plant Pathology**, v.47, n.3, p.299-307, 1998.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/arroz/arrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>. Acesso em: 29/11/2010.

FRANCO, D.F.; RIBEIRO, A.S.; NUNES, C.D.; FERREIRA, E. Fungos associados a sementes de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, n.3, p.235-236, 2001.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; DINOOR, A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Phytopathology**, v. 91, n.7, p.621- 627, 2001.

HARISH, S.; SARAVANAKUMAR, D.; RADJACOMMARE, R.; EBENEZAR E.G.; SEETHARAMAN, K. Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. **Biocontrol**, v.53, p.555-567, 2008.

HEIL, M. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.137–146, 2001.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Sistema de Evaluación Stándart para Arroz**. Los Baños: 1975, 64p.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Standart Evaluation System for Rice**. 4.ed. Manila: 1996. 52p.

JACOBSEN, B.J.; BACKMAN, P.A. Biological and cultural plant disease controls: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. **Plant Disease**, v.77, p.311-315, 1993.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 24-30, 1970.

KAVITHA, S.; SENTHILKUMAR, S.; GNANAMANICKAM, S.; INAYATHULLAH, M.; JAYAKUMAR, R. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. **Process Biochemistry**, v.40, p.3236-3243, 2005.

KAZEMPOUR, M.N. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. **Plant Pathology Journal**, v.3, p.88-96, 2004.

KRISHNAMURTHY K.; GNANMANICKAM S.S. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: evaluation of a marker gene and formulations. **Biological Control**, v.13, p. 58-165, 1998.

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

LEEMAN, M., VAN PELT, J.A., DEN OUDEN, F.M., HEINSBROEK, M., BAKKER, P.A.H.M., SCHIPPERS, B. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, n.85, p.1021-1027, 1995.

- LEWIS, J.A.; FRAVEL, D.R.; PAPAIVIZAS, G.C. *Cladorrhinum foecundissimum*: a potential biological control agent for the reduction of *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology e Biochemistry**, v.27, n.7, p.863-869, 1995.
- LI, S.; WENJING, X.; QIAN, D; CHEN, G.; DONG, Y.; LI, Q. Effect of actinomycetes 769 fermentation products on main defense enzyme activity of rice. **Journal of Jilin Agricultural University**, v.31, n.4, p.382-389, 2009.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W., TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, n.85, p.843-847, 1995a.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W., TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, n.85, p.1064-1068, 1995b.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.48-53, 2007.
- LUDWIG, J; MOURA, A.B. Controle biológico de *Bipolaris oryzae* no arroz irrigado. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.(eds.) **Biocontrole de doenças de plantas no Brasil: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.317-330.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B.; SANTOS, A.S.; RIBEIRO, A.S. Biocontrole da mancha parda e da escaldadura em arroz irrigado, pela microbiolização de sementes. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.5, p.322-328, 2009.
- LUDWIG, J. **Potencial de isolados bacterianos como biocontroladores de nematóides e fungos e como indutores de resistência em plantas de arroz**. 104f. 2009 (Doutorado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas. Tese de Doutorado. 2009.
- MAFFIA, L.A. **Programa para cálculo de área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) GW-BASIC 3.20**. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Fitopatologia, 1986.
- MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* ap-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.296-300, 2008.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.603-612, 2001.
- NUNES, C.D.; RIBEIRO, A.S.; TERRES, A.L. Principais doenças do arroz irrigado e seu controle. In: GOMES, A.S.; MAGALHÃES JUNIOR, A.M. **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.579-633.

NUNES, C.D.M.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Prevalência de raças de *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc em arroz irrigado. V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado. **Anais...** Pelotas, RS, 2007.

O'SULLIVAN, D.J.; O'GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiological Reviews**, v.56, p.662-676, 1992.

OU, S.H. **Rice disease**. 2 ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985. 308p.

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

PARISI, J.J.D.; MALAVOLTA, V.M.A.; LEONEL JUNIOR, F.L. Controle químico de fungos em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). **Summa Phytopathologica**, v.27, p.403-409, 2001.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p.1- 51, 1994.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VERHAGEN, B.W.M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M.L.V.; VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.13, p.277-295, 2005.

PODILE, A.R.; LAXMI, V.D.V. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF1 increases phenylalanine ammonia-lyase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. **Journal of Phytopathology**, v.146, p.255–259, 1998.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. Arroz (*Oryza sativa* L.) controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (eds.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997. v.1. p.554.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e seu controle. In: VIEIRA, N.R. de A.A. SANTOS, A.B. dos; SANT'ANA, E.P. (Eds.) **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 1999. p.262-307.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. Graus de resistência à brusone e produtividade de cultivares melhoradas de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.12, p.1453-1459, 2001.

PRABHU, A.S.; CASTRO, E.M.; ARAÚJO, L.G.; BERNI, R.F. Resistance spectra of six elite breeding lines of upland rice to *Pyricularia grisea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p.203-210, 2003.

- RABINDRAN, R.; VIDHYASEKARAN, P. Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. **Crop Protection**, v.15, p.715-721, 1996.
- RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, n.11, p.1158-1164, 1998.
- RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. **Plant Disease**, v.84, p.1073-1075, 2000.
- RIBEIRO, A.S. **Doenças do arroz irrigado**. Pelotas: Embrapa-CPATB, 1988. 56p. (Circular Técnica 2).
- RODRIGUES, F.; DATNOFF, L.E. Silicon and rice disease management. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.457-469, 2005.
- ROL, S. **Protein purification techniques**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 262p.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 297p.
- ROSALES, A.M.; MEW, T.W. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. **Plant Disease**, v.81, p.49-52, 1997.
- SANTOS, G.R.; CAFÉ-FILHO, A.C.; REIS, A. Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.476-482, 2006.
- SARTORATO, A. Sensibilidade "in vitro" de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, n.3, p.211-213, 2006.
- SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J. Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. **Phytopathology**, v.87, p.177-183, 1997.
- SIBLE, G.V.; MARIMUTHU, T.; RABINDRAN, R.; VELAZHAHAN, R. Induction of resistance in rice against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by foliar application of cow dung water extract. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v.39, p.15-27, 2004.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; CARRER FILHO, R.; PEREIRA, J.L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; MOUNTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, v.152, p. 371-375, 2004.
- SILVA, J.C.M.; COELHO, L. Resistência a fungicidas de *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries fungo causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus* sp. em viveiros florestais. **Ciência Florestal**, v.13, n.2, p27-36, 2003.

SONG, Y.; LI, P.; LI, S.; ZHENG, A.; WANG, L. Studies on promoting ability and induced resistance of antifungal bacterial strain LM-3 in rice. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**, v.19, n.3, p.438-441, 2006.

SOUZA JUNIOR, I.T. **Controle biológico de doenças do arroz: ampliação do espectro de ação e promoção de crescimento pelo uso de combinações de rizobactérias eficientes**. 68f. 2010. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2010.

SOUZA JÚNIOR, I.T.; MOURA, A.B.; SCHAFFER, J.T.; CORRÊA, B.O.; GOMES, C.B. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.11, p.1259-1267, 2010.

SRIVASTAVA, S.; DWIVEDI, U.N. Plant regeneration from callus de *Cuscuta reflexa* – na angiospermic parasite – and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. **Plant Physiology Biochemistry**, n.39, v.529-538, 2001.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

THARA, K.V.; GNANAMANICKAM, S.S. Biological control of rice sheath blight in Índia: lack of correlation between chitinase production by bacterial antagonist and sheath blight suppression. **Plant and Soil**, v.160, p.227-280, 1994.

THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; BONSALL, R.F.; PIERSON, L.S. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.908-912, 1990.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.H.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.

VIDHYASEKARAN, P.; RABINDRAN, R.; MUTHAMILAN, M.; NAYAR, K.; RAJAPPAN, K.; SUBRAMANIAN, N.; VASUMATHI, K. Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. **Plant Pathology**, v.46, p.291-297, 1997.

VIDHYASEKARAN, P.; KAMALA, N.; RAMANATHAN, A.; RAJAPPAN, K.; PARANIDHARAN, V.; VELAZHAHAN, R. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pf1 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice leaves. **Phytoparasitica**, v.29, n.2, p.155-166, 2001.

WEBSTER, R.K.; GRUNNEL, P.S. **Compendium of rice disease**. Minnessota: APS Press, 1992. 62p.

WHIPPS, J.M. Microbial interations and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.478-511, 2001.

WIWATTANAPATAPEE, R.; PENGGOO, A.; KANJANAMANEESATHIAN M.; MATCHAVANICH, W.; NILRATANA, L.; JANTHARANGSRI, A. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: formulations, viability and bacterial release studies. **Journal of Controlled Release**, v.95, p.455-462, 2004.

## **Anexos**

## ANEXO A – Laudo da análise do solo utilizado nos experimentos conduzidos em casa de vegetação

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL**  
**DEPARTAMENTO DE SOLOS**  
**LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE SOLOS**



Nome: Danilo Castilhos

Solicitante: Danilo Castilhos

Município: Capão do Leão

Endereço:

Localidade:

Entrada: 10/2/2010

Emissão: 10/2/2010

Registro	Identificação da amostra	Área (ha)	Sistema de cultivo	Profundidade (cm)	Georef.
7	01				

**Diagnóstico para calagem do solo**

Registro	pH água 1:1	Ca	Mg	Al	H+Al	CTCefetiva	Saturação (%)		Índice SMP
							Al	Bases	
7	5,1	0,3	0,1	0,7	3,5	1,1	64	11	6,2

**Diagnóstico para recomendação de adubação NPK**

Registro	% Mat Org. m/v	% Argila m/v	Textura	P-Mehlich mg/dm <sup>3</sup>	P-resina	C <sup>-</sup> Cph7 cmolc/dm <sup>3</sup>	K mg/dm <sup>3</sup>
7	1	10	4	2,5	--X--	3,9	17

**Diagnóstico para S, micronutrientes e relações molares**

Registro	S	Cu	Zn	B	Fe	Mn	Na	Relações			
								Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	K <sup>+</sup> (Ca+Mg)
7	--X--	--X--	--X--	--X--	--X--	--X--	11	3	6,9	2,3	0,069

Busca

N

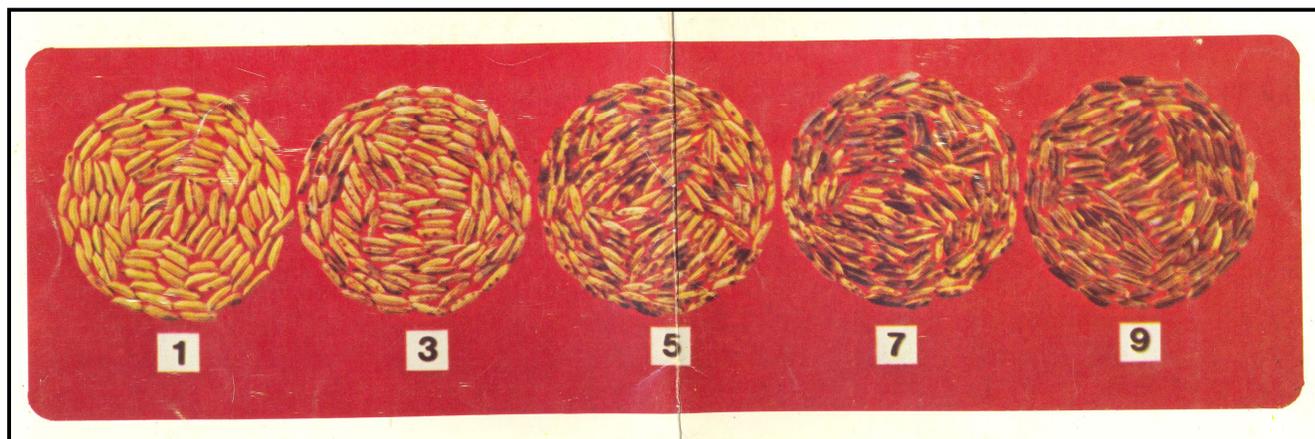
*Renata Peixoto*

Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> Renata Ferrera PeixotoCREA n<sup>o</sup> 92748 - 8<sup>a</sup> Região

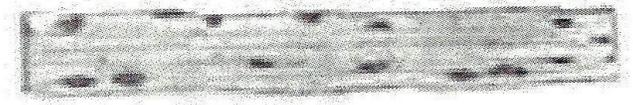
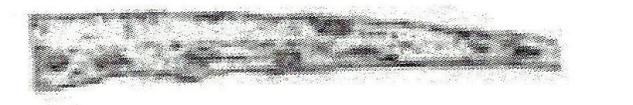
Responsável Técnico



**ANEXO B** - Escala de incidência de manchas em grãos segundo metodologia descrita por IRRI (1975).



**ANEXO C** – Escala de avaliação de severidade de *Bipolaris oryzae* nas folas até o estágio V4 (adaptação de A.S. Ribeiro)

Área foliar afetada		Nota
		1
1%		
		3
5%		
		5
25%		
		7
50%		
		9