

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

**Bactérias biocontroladoras de manchas foliares e  
promotoras de crescimento de arroz: interações com  
cultivares, agrotóxicos e microbiota do solo**

**Renata Moccellin**

Pelotas, 2015

**RENATA MOCCELLIN**

**Bactérias biocontroladoras de manchas foliares e promotoras de crescimento de arroz: interações com cultivares, agrotóxicos e microbiota do solo**

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

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Andrea Bittercourt Moura  
Coorientadores: Dr<sup>a</sup>. Cândida Renata Jacobsen Farias  
Dr<sup>o</sup>. Luciano Carlos da Maia

Pelotas, 2015



## **Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Andrea Bittercourt Moura  
(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cândida Renata Jacobsen Farias

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliane Ludwig

---

Pesquisadora Dra. Andréia Mara Rotta Oliveira

---

Dr<sup>o</sup>. Ismail Teodoro de Souza Júnior

*Aos meus pais Doacir e Maritani Moccellin, e a minha irmã Samira Moccellin por serem meus alicerces, meu porto seguro.*

*Dedico.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente, a Deus por mais esta conquista e pela oportunidade por Ele concedida para que tudo isso se concretizasse.

Aos meus pais, Doacir e Maritani Moccellin, que sempre me apoiaram e ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos.

À minha irmã Samira e meu cunhado Diorgénes por todo amor e carinho oferecido nos momentos de distância.

Ao Marlon Bastiani por todo apoio, compreensão, auxílio, esforço e paciência dedicados para que esse trabalho se consolidasse.

À minha orientadora Professora Dra. Andrea Bittercourt Moura, pela amizade, compreensão e ensinamentos adquiridos ao longo desses quatro anos.

Aos meus co-orientadores Professora Dra. Cândida R. Jacobsen Farias e Professor Dr. Luciano Carlos da Maia pela colaboração nos trabalhos, amizade e ensinamentos durante a realização da tese.

Ao Professor Dr. Marcos Baccarin por disponibilizar a casa de vegetação e laboratório para a realização dos experimentos.

Ao Professor Dr. Danilo Dufech Castilhos pela ajuda concedida na realização dos trabalhos, além de disponibilizar o laboratório para realização das análises.

Ao Dr. Gustavo Funk pela amizade, ajuda, amizade e orientações nos trabalhos realizados na área experimental do IRGA, em Torres, RS.

Ao meu amigo pós-doutorando Demócrito Amorim Chiesa Freitas, que compartilhou muitos desafios, sempre disposto a ajudar nos trabalhos e sempre com uma palavra amiga e de apoio nos momentos de dificuldade. Muito obrigada.

À minha amiga pós-doutoranda Monalize Motta que além da amizade e do companheirismo, se disponibilizou a me ensinar a desvendar os mistérios da biologia molecular.

À minha amiga Fernanda Rezende pelos momentos de descontração, pela amizade e apoio durante esse período.

Aos amigos e colegas da Universidade: Daniela, Bianca, Priscila, Elen Bonilha, Fábio, Keilor, Mauricio, Johan, Silvia, Carla e Jaqueline, por toda ajuda e momentos inesquecíveis de descontração nos corredores e no RU.

Ao estagiário Marcelo Capellari que sempre que possível estava presente nas instalações, cuidados e avaliações dos experimentos.

Aos laboratoristas Sérgio Freitas e Rosária Helena Azambuja, sempre dispostos a ajudar, e solucionar os problemas.

À Dona Nadia que todos os dias alegrava minhas manhãs, com seu “bom dia” bem humorado e alegre.

À Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – UFPel, Departamento de Fitossanidade e ao Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade, pela oportunidade de aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À todos que de alguma maneira estiveram contribuindo para que tudo isso se tornasse realidade.

## Resumo

MOCCELLIN, Renata. **Bactérias biocontroladoras de manchas foliares e promotoras de crescimento de arroz: interações com cultivares, agrotóxicos e microbiota do solo.** 2015. 90f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Algumas espécies bacterianas podem ser utilizadas como biocontroladoras de doenças e promotoras de crescimento de plantas. Contudo, pouco se conhece sobre sua interação com diferentes cultivares de arroz, agrotóxicos e com a microbiota nativa do solo. Mediante ao exposto os objetivos desta pesquisa foram: i) avaliar os efeitos da interação dos isolados bacterianos com diferentes cultivares de arroz no controle da mancha-parda, bem como na promoção de crescimento vegetal na ausência do patógeno; ii) identificar os mecanismos de ação envolvidos no biocontrole e na promoção de crescimento; iii) avaliar o comportamento dos isolados bacterianos na presença de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado; e iv) avaliar o impacto da presença dos isolados bacterianos no solo sobre a microbiota nativa. Os experimentos foram conduzidos em laboratório, casa de vegetação e no campo. Utilizaram-se quatro isolados bacterianos: DFs185, DFs223, DFs306 e DFs416, individualmente ou em combinação, e 11 cultivares de arroz. Os isolados bacterianos comportaram-se de maneira distinta, variando a resposta do controle de mancha parda de acordo com a cultivar, bem como a promoção de crescimento das plantas de arroz. A cultivar BRS Querência foi a que apresentou melhor interação com os tratamentos bacterianos, tanto para o controle da doença, como para a promoção de crescimento. Os tratamentos que se destacaram para as duas finalidades foram DFs185 e DFs223, embora todos os isolados tenham apresentado pelo menos um mecanismo de ação para o biocontrole e também para promoção de crescimento. Todos os isolados mostraram tolerância e/ou resistência a diferentes ingredientes ativos utilizados no cultivo do arroz, bem como alteraram de maneira positiva a qualidade do solo. Dessa forma, os isolados mostraram potencial para serem inseridos no manejo integrado de arroz, desempenhando as funções de controle de doenças e fertilização do solo.

Palavras-chaves: rizobactérias, mancha parda, controle biológico, antibiose.

## Abstract

MOCCELLIN, Renata. **Biocontroller bacteria of leaf spots and promoting growing rice: interactions with crops, pesticides and soil microbes** 2015. 90f. Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Some bacterial species may be used as biocontrol diseases and promoting plant growth. However, is known about their interaction with different rice cultivars, with pesticides and with the native soil microbial. Through the above objectives of this research were: i) to evaluate the effects of the interaction of bacterial isolates with different rice cultivars in controlling brown spot, and promoting plant growth in the absence of the pathogen; ii) identify the mechanisms involved in biocontrol and promoting growth; iii) evaluate the behavior of bacterial isolates in the presence of pesticides used in irrigated rice; and iv) assess the impact of bacterial strains in soil on the native flora. The experiments were conducted in laboratory, greenhouse and field. We used bacterial strains: DFs185, DFs223, and DFs306 DFs416 individually or in combination, and 11 rice cultivars. The bacterial isolates behaved differently, varying the response of brown spot control according to cultivate and promote growth of rice plants. The BRS Querencia presented the best interaction with bacterial treatments, both for disease control and for promoting growth. Treatments that stood out for two purposes were DFs185 and DFs223, although all isolates have submitted at least one mechanism of action for the biocontrol and for growth promotion. All strains showed tolerance and / or resistance to different active ingredients used in rice cultivation, and positively changed soil quality. Thus, the isolates showed potential to be inserted in the integrated management of rice, performing the control functions of diseases and soil fertilization.

Keys-words: rhizobacteria, brown spot, biological control, antibiosis.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Teste de antibiose para observação da produção de compostos antibióticos (A), e produção de compostos voláteis (B) produzidos pelos isolados bacterianos testados DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223(*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificado) e DFs416 (*Bacillus* sp.). Testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) (C) para o rastreamento de genes envolvidos na produção de antibiótico (M) marcador 1 kb (Promega); (1) *Pseudomonas synxantha* (DFs185); (2) *Pseudomonas fluorescens* (DFs223); (3) bactéria não identificada (DFs306); (4) *Bacillus* sp. (DFs416); (5) branco. ....38

## Lista de Tabelas

- Tabela 1 – Descrição das cultivares utilizadas na condução dos experimentos .....22
- Tabela 2 – Primers e as condições de amplificação para a detecção, baseada em PCR, de diferentes de genes que codificam para os antibióticos (Adaptado de Raaijmakers et al., 1997 e Naik et al., 2008) .....32
- Tabela 3 – Análise de variância mostrando o efeito da cultivar, tratamento bacteriano e suas interações sobre a área abaixo da curva do progresso da doença plântulas de arroz inoculadas em estágio V3 com *Bipolaris oryzae*, em dois anos de experimentos em casa de vegetação.....33
- Tabela 4 – Severidade de brusone (*Pyricularia grisea*), em estágio V6, de acordo com uma escala de notas, descrita por IRRI (1996), na cultivar El Paso 144L, em que as sementes foram microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos e BION, cultivadas no ano de 2013, na área experimental do IRGA em Torres, RS .....35
- Tabela 5 – Severidade de brusone (*Pyricularia grisea*) e macha parda (*Bipolaris oryzae*), em estágio V6, de acordo com uma escala de notas, descrita por IRRI (1996), na cultivar El Paso 144L, em que as sementes foram microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos e BION, cultivadas no ano de 2013, na área experimental do IRGA em Torres, RS .....35
- Tabela 6 – Contagem de conídios de *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz, desenvolvidas a partir de sementes de arroz (IRGA 420) que foram microbiolizadas com isolados bacterianos .....36
- Tabela 7 – Produção de compostos associados ao biocontrole por isolados bacterianos.....37
- Tabela 8 – Produção de compostos antibióticos hidrossolúveis e voláteis, pelos isolados bacterianos: DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificado) e DFs416

( <i>Bacillus</i> sp.) avaliados por pareamento de culturas e placas sobrepostas, respectivamente .....	38
Tabela 9 – Teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção de genes envolvidos na produção de antibióticos por <i>Pseudomonas synxantha</i> (DFs185), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (DFs223), isolado não identificado (DFs306) e <i>Bacillus</i> sp. (DFs416) .....	39
Tabela 10 – Descrição das cultivares utilizadas na condução dos experimentos .....	48
Tabela 11 – A de variância mostrando o efeito da cultivar, tratamento bacteriano e suas interações sobre o número de folhas, altura e massa seca de parte área de plantas de arroz .....	52
Tabela 12 – Habilidades dos isolados bacterianos, DFs185 ( <i>Pseudomonas synxantha</i> ), DFs223 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> ), DFs306 (não identificada) e DFs416 ( <i>Bacillus</i> sp), relacionadas à promoção de crescimento .....	53
Tabela 13 – Ingrediente ativo, concentração do produto comercial e dose dos agrotóxicos (fungicidas, herbicidas e inseticidas) utilizados nos ensaios de compatibilidade .....	64
Tabela 14 – Avaliação da compatibilidade de quatro isolados bacterianos frente a diferentes ingredientes ativos de fungicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado .....	70
Tabela 15 – Avaliação da compatibilidade de quatro isolados bacterianos frente à diferentes ingredientes ativos de herbicidas recomendados para cultura do arroz irrigado .....	71
Tabela 16 – Avaliação da compatibilidade de quatro isolados bacterianos frente a diferentes ingredientes ativos de inseticidas recomendados para cultura do arroz irrigado .....	72
Tabela 17 – Número de unidades formadoras de colônias, por placa, de isolados bacterianos, utilizando apenas como fonte de carbono e nitrogênio presentes nos ingredientes ativos de três fungicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado .....	74
Tabela 18 – Teores de carbono orgânico total, carbono microbiano e quociente microbiano, em solo cultivado com sementes arroz irrigado tratadas com isolados bacterianos e Bion® .....	75

## Lista de Quadros

- Quadro 1 – Área abaixo da curva do progresso da doença plântulas de arroz inoculadas em estágio V3 com *Bipolaris oryzae*, que tiveram suas sementes microbiolizadas com isolados bacterianos, cultivadas no ano de 2013 em casa de vegetação, climatizada .....33
- Quadro 2 – Área abaixo da curva do progresso da doença de plântulas de arroz inoculadas em estágio V3 com *Bipolaris oryzae*, que tiveram suas sementes microbiolizadas com isolados bacterianos, cultivadas no ano de 2014 em casa de vegetação, climatizada .....34
- Quadro 3 – Quadro do número de folhas de cultivares de arroz irrigado que tiveram as sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, conduzidos em casa de vegetação climatizada e avaliada nos estágios V4 e V9 em cinco experimentos, em que (□) menor que a testemunha; (■) maior que a testemunha sem diferença estatística e (■) maior que a testemunha com diferença estatística .....55
- Quadro 4 – Quadro da altura de cultivares de arroz irrigado que tiveram as sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, conduzidos em casa de vegetação climatizada e avaliada nos estágios V4 e V9 em cinco experimentos, em que (□) menor que a testemunha; (■) maior que a testemunha sem diferença estatística e (■) maior que a testemunha com diferença estatística. ....56
- Quadro 5 – Quadro da massa seca de parte aérea de cultivares de arroz irrigado que tiveram as sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, conduzidos em casa de vegetação climatizada e avaliada nos estágios V4 e V9 em cinco experimentos, em que (□) menor que a testemunha; (■) maior que a testemunha sem diferença estatística e (■) maior que a testemunha com diferença estatística. ....57

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>2. CAPÍTULO I – Bactérias biocontroladoras da mancha parda em diferentes cultivares de arroz.....</b>	<b>19</b>
2.1 Introdução.....	19
2.2 Material e Métodos .....	21
2.3 Resultados.....	33
2.4 Discussão .....	39
2.5 Conclusões.....	43
<b>3. CAPÍTULO II – Bactérias promotoras de crescimento em diferentes cultivares de arroz.....</b>	<b>45</b>
3.1 Introdução.....	45
3.2 Material e Métodos .....	47
3.3 Resultados.....	52
3.4 Discussão .....	58
3.5 Conclusões.....	60
<b>4. CAPÍTULO III – Interação das bactérias biocontroladoras com agrotóxicos e microbiota do solo .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>61</b>
4.2 Material e Métodos .....	63
4.3 Resultados.....	69
4.4 Discussão .....	76
4.5 Conclusões.....	78
<b>5. Considerações Finais.....</b>	<b>79</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) é considerada uma das mais importantes, pois é responsável por alimentar milhões de pessoas em todo o mundo. É um cereal rico em carboidratos, proteínas e principal refeição dos brasileiros, sendo considerado pelo governo um produto de segurança alimentar (SOSBAI, 2014).

O Brasil é um dos principais produtores de arroz do mundo, ocupando o décimo lugar no ranking. A produção de arroz no Brasil para a safra 2013/2014 foi de 12.161,7 mil de toneladas, sendo o estado do Rio Grande do Sul (RS) responsável por 8.112,9 mil de toneladas de arroz, conferindo a ele o posto de maior produtor de arroz do Brasil (CONAB, 2014).

A produtividade da cultura no RS poderia ser maior se não fosse limitada por diversos fatores, entre eles as condições nutricionais do solo, que são pobres em nitrogênio e fósforo. Essa condição requer grande aporte de adubação química, que aumenta os custos de produção, além de causar contaminação do ambiente. Outro fator limitante, é que a cultura do arroz está sujeita ao ataque de diversas doenças cujos danos podem causar sérios prejuízos à cultura. Algumas doenças se destacam, como: brusone, mancha-parda e escaldadura, e queima-das-bainhas.

A brusone destaca-se como a principal doença do arroz, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) (telemorfo: *magnaphorte grisea* (T.T. Herbert) Yaegashi & Udagawa), pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Hemiascomycetes, Diaporthales e Magnaporthaceae (LUZ, 2001). Seus conídios são periformes, hialinos e apresentam três septos (HOWARD; VALENT, 1996). Os danos causados a cultura podem comprometer até 100% da produção da lavoura em anos em que as condições ambientais são favoráveis à doença (FUNCK; KEMPF, 2010).

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Hann) Shoemaker [telemorfo *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayasi) Drechsler ex Dastur)], pertencente ao grupo dos ascomicetos da ordem *Sphaeriales*, família *Sphaeriaceae* (GALI et al., 1980). Apresenta massa micelial aveludada e escura (PADWICK, 1950), e conídios levemente curvos, mais largos no centro afinando-se para o ápice, e quando maduros possuem coloração castanha (OU, 1985; MEW; GONZALES, 1982). Este fungo é causador da doença conhecida como mancha parda, na cultura do arroz, sendo uma doença que vem ganhando maior intensidade nos últimos anos, principalmente nas regiões do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, principalmente pelas cultivares serem mais suscetíveis ao patógeno (PRABHU; FILIPPI, 1997; MALAVOLTA et al., 2002; SOSBAI, 2012).)

As principais medidas de controle, para ambas as doenças, são o uso de cultivares resistentes e de fungicidas. Entretanto, as cultivares de arroz desenvolvidas para o controle de mancha parda não tem apresentado níveis desejáveis de resistência, ou ainda não estão disponíveis para a comercialização (NUNES et al., 2004), diferentemente do que ocorre para a brusone, no qual o uso de cultivares resistentes é principal medida de controle utilizada (PRABHU et al., 2002). O uso de fungicidas seria o mais indicado, mas essa prática eleva os custos de produção, pode causar intoxicação do aplicador do produto, e provocar contaminação ambiental, aumentando a pressão de seleção e levando ao surgimento de populações do patógeno resistentes a estes compostos químicos (CELMER et al., 2007). Juntamente a isso tem crescido a exigência dos consumidores por alimentos livres de agrotóxicos.

Uma alternativa para solucionar os dois problemas destacados acima, consiste no uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas, também conhecidas como bactérias biocontroladoras. Essas possuem mecanismos que afetam diretamente o crescimento de plantas, por meio da fixação do nitrogênio atmosférico e solubilização do fósforo, permitindo maior disponibilidade para absorção destes pela planta; produção de sideróforos, pois conseguem sequestrar  $Fe^{3+}$ ; produção de hormônios, como ácido indol-acético (IAA) que estimulam o crescimento das raízes aumentando a absorção de nutrientes (SELOSSE et al. 2004; VEGA, 2007); produção de enzimas, como 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC) pois reduz a presença de etileno, estimulando o crescimento da planta (FORCHETTI et al. 2007). Os mecanismos de biocontrole de patógenos, que também atuam indiretamente no crescimento são a competição por meio da produção

de sideróforos; o parasitismo especialmente pela produção das enzimas líticas  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases; a antibiose devido à produção de compostos antimicrobianos (GLICK; PASTERNAK, 2003); e a indução de resistência sistêmica (TUZUN; KLOEPPER, 1994).

Nos últimos anos vem se estudando esses mecanismos, e sabe-se que as bactérias protegem as plantas e influenciam o crescimento de formas distintas variando de espécie para espécie (GLICK et al., 1999). Entre essas podemos destacar as pertencentes aos gêneros: *Azospirillum* (AMBROSINI et al., 2012), *Bacillus* (BENEDUZI et al., 2008), *Burkholderia* (AMBROSINI et al., 2012), *Pseudomonas* (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2006), entre outras.

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos na cultura do arroz visando à promoção de crescimento como os realizados por Sousa et al. (2013) e Etesami, Hosseini e Alikhani (2014), com resultados promissores. O número de trabalhos que têm identificado o potencial biocontrolador de bactérias é bem maior, observando-se o controle de brusone (VIDHYASEKARAN et al., 1997), escaldadura e mancha parda (LUDWING et al., 2009), queima-das-bainhas (NANDAKUMAR et al., 2001, COMMARE et al., 2002, WIWATTANAPATAPEE et al., 2004; LUDWING; MOURA, 2007), galhas causadas por *Meloidogyne graminicola* (PADGHAM; SIKORA, 2006) e crestamento bacteriano causado por *Xantomonas oryzae* e pv. *oryzae* (VIDHYSEKARAN et al., 2001). Por outro lado, poucos são os estudos que analisam o biocontrole a promoção de crescimento simultaneamente (SOUZA-JUNIOR et al., 2010).

Por se tratarem de organismos vivos, o comportamento das bactérias varia de acordo com as condições do ambiente, em que são inseridas, com as cultivares que serão cultivadas, com os compostos utilizados e também com o manejo da lavoura durante seu desenvolvimento. Portanto, todos esses fatores podem influenciar na eficiência dos tratamentos.

Assim, para reduzir as oscilações que podem que dificultar a adoção do uso de rizobactérias em ampla escala, tem-se adotado a estratégia de combinar isolados bacterianos que possuam características distintas, buscando maior estabilidade com maior espectro de ação (DE BOER et al., 2003).

Outra possibilidade a ser explorada que pode afetar a eficiências das bactérias é a integração com outras práticas culturais, principalmente ao uso de agrotóxicos. Por essa razão há necessidade de conhecer alguns produtos químicos que possam

ser utilizados juntamente com essas bactérias constituindo uma estratégia do controle integrado de doenças (BUCHENAUER, 1998).

Por outro lado, a introdução de microrganismos no solo, por meio da microbiolização das sementes, com bactérias biocontroladoras e/ou promotoras de crescimento pode interferir na comunidade nativa do solo, pois pode resultar em uma maior competição por espaço, nutrientes e água (PRASHAR; KAPOOR; SACHDEVA, 2014).

Mediante ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo: i) avaliar os efeitos da interação dos isolados bacterianos com diferentes cultivares de arroz no controle da mancha-parda, bem como na promoção de crescimento vegetal ii) identificar os mecanismos de ação envolvidos na promoção de crescimento e no biocontrole iii) avaliar o comportamento dos isolados bacterianos na presença de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado; iv) avaliar o impacto da introdução dos isolados bacterianos no solo, sobre a microbiota nativa.

## 2. CAPÍTULO I – Bactérias biocontroladoras da mancha parda em diferentes cultivares de arroz

### 2.1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais espécies cultivadas no mundo, especialmente devido ao seu papel socioeconômico, como também atuando na parte social, por ser consumido por mais da metade da população mundial (YONG; PELLET, 1997). O estado do Rio Grande do Sul produz 8.112,9 mil toneladas de arroz, sendo considerado o maior produtor nacional, tendo em média uma produtividade de 7.450 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2014). Essa produtividade poderia ser mais elevada, se não fosse, entre outros fatores, à ocorrência de doenças fúngicas que podem causar perdas na produtividade da lavoura de 20 a 50% (BALARDIN; BORIN, 2001).

Dentre as doenças fúngicas que causam grandes prejuízos na cultura do arroz podemos destacar a brusone, mancha parda, queima-das-bainhas, e a escaldadura. A principal doença, brusone, é causada pelo fungo *Pyricularia grisea*, que está amplamente distribuído por todos os estados produtores de arroz. O fungo pode infectar toda parte aérea da planta, produzindo manchas e/ou lesões sobre as folhas, nós e diferentes partes das panículas e grãos. Em cultivares suscetíveis, ao redor das manchas podem aparecer halos amarelados, enquanto que em cultivares resistentes aparecem apenas pequenas manchas. (GOMES et al., 2004; EPAGRI, 2005; PRABHU; FILIPPI, 2006). A *P. grisea* caracteriza-se por ser um fungo de alta variabilidade genética, sendo descritos cerca de 256 raças fisiológicas do fungo o que pode dificultar a obtenção de cultivares resistentes. Na região Sul do país foram identificadas 50 raças fisiológicas do fungo, sendo o uso de cultivares resistentes o método mais eficiente, simples e econômico para o controle da brusone (EPAGRI, 2005)

O fungo *Bipolaris oryzae* agente causal da mancha-parda, está distribuído em todas as regiões produtoras de arroz, sendo que em algumas regiões é considerada a principal doença da cultura (NUNES et al., 2004). No Estado do Rio Grande do Sul essa doença causa grandes danos nas lavouras de arroz irrigado, pois o fungo pode ocorrer durante a fase de germinação das sementes, resultando na morte das plântulas reduzindo o estande de plantas (BEDENDO; PRABHU, 2005). Nas folhas, surgem manchas de forma ovalada, com coloração marrom avermelhada, geralmente com o centro acinzentado, onde encontram-se as estruturas reprodutivas do patógeno (OU, 1985). Esta doença pode resultar na produção de grãos chochos e também causar manchas nos grãos, podendo levar à redução de até 30% no peso dos grãos, e de 22% no número de grãos cheios por panícula. Finalmente leva a perda na qualidade por causa da coloração escura dos grãos e do gessamento destes, gerando perdas durante o beneficiamento do produto (NUNES et al., 2004).

O controle das doença é realizado pelo uso de cultivares resistentes e/ou uso de fungicidas (PRABHU; FILIPPI, 1997), mas esses métodos de controle apresentam algumas limitações, como o uso excessivo de fungicidas que possibilita o aparecimento de populações resistentes do patógeno, acarretando na menor eficiência do produto (CELMER et al., 2007).

Diante do exposto, o controle biológico surge como uma boa opção para o controle do patógeno. Estudos mostram que algumas bactérias benéficas possuem a habilidade de controlar os microrganismos patogênicos como demonstraram Wiwattanapatapee et al. (2007) e Yang et al. (2008) que afirmam que isolados de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. apresentam potencial de controle para brusone e queima-das-bainhas.

Resultados promissores também foram encontrados para o controle de mancha parda fazendo o uso de isolados bacterianos individualmente (LUDWIG et al., 2009) e combinados (SOUZA-JÚNIOR, 2010), embora não se conheçam os mecanismos envolvidos neste controle.

De modo geral, a atividade antagonista ocorre pela produção de antibióticos, pela competição por sítios de colonização, nutrientes, pelo parasitismo, envolvendo a produção de enzimas degradantes como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase e pela indução de resistência (WHIPPS, 2001). Portanto, faz-se necessário conhecer os modos de ação dos isolados bacterianos, para que se possa trabalhar de maneira a maximizar sua eficiência, tanto no sentido de favorecer os biocontroladores, quanto de combiná-

los de modo a diversificar e/ou intensificar estes mecanismos (YANG et al., 2008; HERNADEZ-LEON et al., 2015).

Por outro lado, o comportamento de biocontroladores pode ser influenciado quando em associação com diferentes genótipos de uma mesma espécie cultivada, ou ainda diferentes populações de uma dada espécie de patógeno. Bactérias biocontroladoras da mancha parda do arroz, quando usadas individualmente também apresentaram interação com diferentes cultivares e isolados de *B. oryzae* (LUDWIG; MOURA, 2009), embora não se conheça o comportamento destas quando combinadas.

Desse modo, presente estudo teve como objetivo avaliar a interação entre bactérias combinadas ou não e diferentes cultivares de arroz no controle da mancha parda, bem como identificar quais os mecanismos de ação podem estar associados ao controle da doença.

## **2.2 Material e Métodos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casa de vegetação climatizada, pertencentes à Universidade Federal de Pelotas.

### **2.2.1 Isolados e tratamentos utilizados**

O fungo de *B. oryzae* utilizado no experimento faz parte da micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes pertencente à Universidade Federal de Pelotas, isolados de sementes de arroz.

Os isolados bacterianos utilizados são pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas. Estes isolados foram isolados por Moura e colaboradores em 1997 (MOURA et al., 1998) e selecionadas por Ludwig et al., (2009) e suas combinações por Souza-Júnior (2010). Os isolados bacterianos utilizados foram: DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificada) e DFs416 (*Bacillus* sp.), sendo estes utilizados individualmente (DFs185, DFs223 e DFs306) ou em combinação: C01 (DFs185 + DFs306), C02 (DFs306 + DFs416) e C03 (DFs185 + DFs306+ DFs416), e como controle utilizou-se solução salina (NaCl 0.85).

### 2.2.2 Cultivares utilizadas

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas sete cultivares desenvolvidas para o cultivo de arroz irrigado para o plantio no Rio Grande do Sul, descritas na tab. 1.

Tabela 1 – Descrição das cultivares utilizadas na condução dos experimentos

Cultivar	Instituição detentora	Ciclo*	Resistência**		Tipo de grão
			Mancha parda	Brusone	
BRS Atalanta	Embrapa	MP	SI	MS	LF
BRS Pelota	Embrapa	M	MR	MR	LF
BRS Querência	Embrapa	P	SI	MS	LF
El Paso 144L	-	M	S	S	LF
IRGA 420	IRGA	M	MR	MR	LF
IRGA 427	IRGA	M	SI	R	LF
Qualimax 1	Aventis	M	MR	MR	LF

\*MP: médio-precoce, 90-100 dias; P: precoce, 100-120 dias; M: médio, 120-130 dias. \*\*SI: sem informação; R: resistente; MR: médio-resistente; S: suscetível. Fonte: SOSBAI (2010; 2012; 2014).

### 2.2.3 Preparo das suspensões e microbiolização das sementes

Os isolados bacterianos foram repicados para placas de Petri contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e incubadas a 28°C por 48 horas. Após o crescimento destas, foi adicionada solução salina (NaCl 0,85%) às colônias formadas, para obtenção das suspensões, ajustadas em espectrofotômetro para  $A_{540}=0,5$ , correspondendo a  $10^8$  unidades formadoras de colônias. As combinações foram obtidas a partir de suspensões dos isolados preparados individualmente e com as concentrações ajustadas, misturadas em volumes iguais.

As sementes de arroz foram imersas nas suspensões bacterianas sob agitação, durante 30 minutos, à 10°C,. As sementes testemunhas foram imersas somente em solução salina.

#### 2.2.4 Plantio e condução dos experimentos em casa de vegetação

Os experimentos foram realizados em dois anos, 2013 e 2014, sendo no primeiro experimento utilizado cinco cultivares: BRS Atalanta, El Paso 144L, IRGA 427, Qualimax 1 e BRS Querência. No segundo ano as cultivares El Paso 144L e Qualimax 1 foram substituídas, devido à dificuldade de encontra-las, por outras cultivares, IRGA 420 e BRS Pelota, respectivamente.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições, arranjadas em esquema fatorial 5x7, onde o fator A foi composto pelas cultivares de arroz irrigado e o fator B constituído pelos tratamentos bacterianos. As unidades experimentais (u.e.) foram constituídas por copos plásticos com capacidade de 750 mL que foram cheios com solo de várzea, não esterilizado, classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico solódico (STRECK et al., 2002). Em cada u.e. foram depositadas cinco sementes. Para dos dois experimentos quando as plântulas atingiram o estágio V3 (COUNCE et al., 2000), realizou-se o desbaste, deixando-se apenas duas plântulas por u.e.

Os esporos de *B. oryzae* foram obtidos a partir de colônias puras com 15 dias de crescimento em meio BDA (batata, dextrose, ágar), contendo pedaços de tifa (*Typha latifolia*). A concentração de esporos utilizada foi de  $10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>. As plântulas de arroz foram pulverizadas quando atingiram o estágio V5 (COUNCE et al., 2000). As plântulas foram mantidas em câmara úmida 24 horas antes e 48 horas após a inoculação.

As plântulas foram avaliadas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno, por meio de notas atribuídas de acordo com a severidade da doença. Utilizou-se a escala descrita no trabalho de Ludwig e Moura (2009) para avaliar plântulas onde se atribuiu-se 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. Posteriormente, foi calculada a Área Abaixo a Curva de Progresso da Doença (AACPD) a partir dos valores de severidade anotados durante as três avaliações, de acordo com a seguinte equação 1.

$\Sigma = \left(\frac{n_1 + n_2}{2}\right) \times n^\circ \text{ de dias} + \dots \left(\frac{n_x + n_x}{2}\right) \times n^\circ \text{ de dias}$ ), [eq. 01], onde:

n1: nota do primeiro dia a ser avaliada a severidade;

n2: nota do segundo dia a ser avaliada a severidade;

nº de dias: dias transcorridos entre a primeira e a segunda avaliação.

As variáveis respostas foram submetidas à análise da variância pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ) e quando significativos, foi realizado a comparação de médias dos tratamentos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste Scott-Knott, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7

### 2.2.5 Plantio e condução dos experimentos no campo

Os experimentos foram realizados na área experimental do Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA), que é rotineiramente utilizada para avaliação de resistência de genótipos de arroz irrigado. Essa área está localizada em Areia Grande, no município de Torres-RS. Este local foi escolhido por ser uma área em que são realizadas práticas de manejo que favorecem a ocorrência e a disseminação de doenças.

Foram realizados dois experimentos, o primeiro na safra de 2012/2013, em que foi semeado a cultivar El Paso 144L, por ser uma cultivar altamente suscetível a diversas doenças. O segundo experimento foi semeado na safra 2013/2014, e a cultivar El Paso 144L foi substituída pela IRGA 420, que também apresenta suscetibilidade a doenças, e está sendo cultivada no estado com maior expressão, uma vez que a El Paso 144L é semeada cada vez em menores extensões, sendo difícil a aquisição de sementes no mercado brasileiro.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental de blocos ao acaso contendo três repetições. Os tratamentos utilizados foram descritos na tabela 01, mais o tratamento adicional BION® (10g de produto comercial por 100 kg de sementes).

As unidades experimentais foram compostas por parcelas de 1,20 m de comprimento por 0,60 m de largura, contendo quatro linhas espaçadas por 0,15 m. A densidade de semeadura utilizada para os dois experimentos foi de 110 kg ha<sup>-1</sup>.

A área onde foram instalados os experimentos teve o solo corrigido de acordo com o recomendado (SOSBAI, 2014). A bordadura foi semeada, 20 dias antes da semeadura das parcelas com genótipos a serem testados, com um mix das cultivares suscetíveis aos patógenos da cultura do arroz. Quando as plantas atingiram o V3 (COUNCE et al., 2000), foram pulverizadas com diversos patógenos da cultura, para que a infecção nos genótipos a serem testados, ocorresse de forma natural.

As duas linhas centrais foram utilizadas para fazer as avaliações de severidade. As avaliações foram realizadas nas folhas aos 44 dias após a semeadura, e utilizou-se a escala de avaliação do IRRI (1996), onde: 0: sem sintomas (resistente - R); 1: pequenas pontuações de cor marrom (R); 2: pontuações de cor marrom de 1 a 2 mm necróticas, sem centro esporulativo, nas folhas inferiores (R), 3: pontuações de cor marrom de 1 a 2 mm necróticas, sem centro esporulativo, nas folhas superiores (R); 4: lesões típicas da doença, elípticas de 3 mm ou mais de comprimento (medianamente resistente -MR); 5: lesões típicas da doença apresentando de 4 à 10% da área foliar infectada (MR); 6: lesões típicas da doença apresentando de 11 a 25% da área foliar infectada (medianamente suscetível -MS); 7: lesões típicas da doença apresentando de 26 a 50% da área foliar infectada (MS); 8: lesões típicas da doença apresentando de 51 a 74% da área foliar infectada (suscetível -S); 9: lesões típicas da doença apresentando mais de 75% da área foliar infectada (S).

A condução dos experimentos foi à mesma para os dois anos, sendo avaliados a severidade para brusone e mancha parda utilizando-se a escala de IRRI (1996).

As variáveis respostas foram submetidas à análise da variância pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ) e quando significativos, foi realizado a comparação de médias dos tratamentos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste Scott-Knott, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7.

### **2.2.6 Bioensaios**

Esse bioensaio foi montado com o objetivo de observar, se os tratamentos bacterianos poderiam influenciar no desenvolvimento do *B. oryzae*. Primeiramente foi feito um teste utilizando folhas destacadas de arroz.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos inteiramente casualizado contendo quatro repetições. Os tratamentos utilizados foram descritos no item 2.2.1.

As sementes da cultivar IRGA 420 foram microbiolizadas de acordo com o item 2.2.3, e semeadas em copos de 300 mL de capacidade, que continham substrato comercial não esterilizado. Foram depositadas 5 sementes em cada copo, e mantidas em sala de crescimento 12 horas luz e 12 horas escuro.

Quando as plântulas atingiram estágio V3 (COUNCE et al., 2000), selecionaram-se as folhas com melhor desenvolvimento, e estas foram cortadas, com uma tesoura. Em seguida essas folhas, foram fixadas em papel germiteste, estéreis e umedecidos com água estéril, inseridas em caixas gerboxes desinfestadas.

As folhas foram borrifadas, até o escorrimento, com suspensão de *B. oryzae*, preparada de acordo com o item 2.2.4. Os gerboxes foram fechados e incubados em sala de crescimento 12 horas luz e 12 horas escuro.

Outro teste foi realizado utilizando a planta viva, esse teste foi realizado duas vezes, sendo a montagem igual ao descrito anteriormente, com a exceção que estas foram mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação com o patógeno.

Quando as plantas atingiram o estágio V3, elas foram inoculadas com *B. oryzae*, conforme descrito no item 2.2.4. Após o período de câmara úmida elas foram transferidas para sala de crescimento 12 horas luz e 12 horas escuro, para monitoramento dos sintomas.

Para os dois testes foram avaliados os seguintes parâmetros em microscópio estereoscópico e ótico: período de incubação (dias) – onde foi considerado PI os dias transcorridos entre inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas; início da esporulação dias após a inoculação (dias) – IE o tempo transcorrido entre o aparecimento dos sintomas e a presença dos sinais do patógeno (esporos) sobre os sintomas.

Foi realizada também a contagem de lesões e de esporos. As folhas que continham lesões foram cortadas e transferidas para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água destilada. Os tubos foram agitados para que houvesse o desprendimento dos conídios. Após, com o auxílio de uma pipeta de Pauster retirava-se uma alíquota de 1 mL da amostra que era transferida para uma câmara de Neubauer, para contagem dos conídios de *B. oryzae*. Foram realizadas três contagens de cada tratamento.

As variáveis analisadas foram submetidas a análise da variância pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), e quando significativos, foi realizado a comparação de médias dos tratamentos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ), pelo teste Scott-Knott, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7.

### 2.2.7 Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos

A capacidade das bactérias biocontroladoras em produzir enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos foi avaliada utilizando um ou mais meios específicos para cada composto. Quando foram utilizados meios em placas, estas foram vertidas 18 horas antes do uso e incubadas a 28°C visando à redução da umidade superficial, de modo a evitar o espalhamento excessivo dos isolados de *Bacillus*. Nessas foram semeadas pequenos círculos (spots) das bactérias a serem avaliadas e uma bactéria com atividade sabidamente positiva e outra negativa, usadas como controles da avaliação.

Para cada teste foram utilizadas seis repetições, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas após diferentes tempos de incubação, estabelecidos em função do composto avaliado e metodologia usada.

Quando possível, foram realizadas avaliações quantitativas medindo-se os diâmetros das colônias ( $\emptyset C$ ) e dos halos formados ( $\emptyset H$ ) no meio de cultura em dois sentidos diametralmente opostos, utilizando-se paquímetro digital. Nesse caso, os resultados foram expressos como diâmetro relativo de halo ( $\emptyset RH$ ) calculado pela equação 2.

$$\emptyset RH = (\emptyset H - \emptyset C) / \emptyset C. \text{ [eq.2]}$$

As avaliações qualitativas foram registradas como ocorrência ou não, e caso positivo, também se determinou o número de horas para a visualização do resultado positivo.

### 2.2.7.1 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas

#### a) Hidrólise de carboidratos

Para avaliar a capacidade dos isolados em hidrolisar carboidratos, foram feitos testes para: carboidratos estruturais (celulose, glucana, quitina e pectina), não estruturais (amido).

A produção de enzimas celulolíticas foi avaliada, utilizando-se o meio de cultura carboximetilcelulose (KASANA et al., 2008) incubando-se as placas semeadas sob temperatura de 28°C por 2 dias. Após esse período, adicionaram 5 mL de solução lugol, e avaliou-se a produção de celulases, a partir da presença de um halo translúcido ao redor das colônias. Posteriormente, os diâmetros das colônias e dos halos presentes no meio foram mensurados.

Para observação da produção de enzimas glucanases, utilizou-se o meio de cultura MLN, usando como única fonte de carbono a laminarina ( $\beta$ -1,3-glucano – SIGMA® L9634) (CATELLAN, 1999). As placas foram semeadas e incubadas à 28°C, por três dias. Para avaliação foi adicionado vermelho Congo (5 mL), e deixado em temperatura ambiente por 90 minutos. A presença de halo amarelo-alaranjado ao redor das colônias foi considerado positivo, havendo hidrólise de  $\beta$ -1,3-glucano.

O potencial de produção de quitinases dos isolados foi avaliado usando o meio de quitina a 0,5 %, cuja única fonte de carbono foi à quitina (SIGMA® C9752), de acordo com a metodologia descrita por Cattelan (1999). As placas foram semeadas e incubadas a 28°C, por 21 dias.

A produção de pectinases, no qual foi utilizado meio M9 (MILLER, 1974) de acordo com o descrito por Catellan (1999). Os isolados foram semeados nas placas e incubadas a 28°C por 4 dias. A avaliação foi feita por meio da observação de um halo claro ao redor das colônias.

Por fim, para avaliar a produção de amilases, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-amido e incubados sob temperatura de 28°C, no escuro, por quatro dias. Passado esse período adicionaram 5 mL de solução lugol. A produção de amilases foi verificada pela presença de um halo de degradação incolor ao redor das colônias (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

#### b) Hidrólise de proteínas

A capacidade proteolítica foi testada utilizando três substratos diferentes: caseína, esculina e gelatina.

Para avaliação da capacidade de degradação de caseína pelos isolados biocontroladores, testou-se o meio de cultura Leite-Ágar (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Os isolados biocontroladores foram semeados e incubados a 28°C, pelo período de seis dias. A avaliação, foi realizada pela observação de alteração do meio, de leitoso para translucido, indicando o resultado positivo (SCHAAD et al., 2001).

Para verificação da hidrólise de esculina os isolados foram semeados em placas de Petri em meio de esculina, e incubados sob temperatura de 28°C no escuro, por quatro dias. A observação dos resultados foi sob luz UV (254 nm), a mudança de coloração do meio, de fluorescente a escuro ao redor das colônias, indicou a hidrólise de esculina. Em razão da formação difusa dos halos não foi possível realizar mensuração destes.

A proteólise de gelatina foi avaliada em tubos de ensaio contendo 4 mL de meio de gelatina (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Após 72 e 96 horas de incubação sob temperatura de 28°C no escuro, foram realizadas as avaliações colocando-se os tubos em geladeira por 30 minutos. Consistiram-se em reações positivas aquelas que mantiveram a forma líquida e, negativas, aquelas em que meio tornou-se sólido.

#### c) Hidrólise de lipídeos

A produção de esterases foi determinada utilizando-se meio ágar nutriente com solução de gema de ovo a 4%, incubados sob temperatura de 28°C no escuro, por seis dias (SCHAAD et al., 2001). A avaliação positiva foi baseada na presença de halo de degradação presente no meio ao redor das colônias.

A capacidade lipolítica também foi avaliada utilizando-se o meio de cultura de Tween 80 (FAHY; PERSLEY, 1983), após incubação sob temperatura de 28°C no escuro, por seis dias. Como resultado positivo, observou-se o desenvolvimento de um precipitado branco – leitoso ao redor das colônias, o que indicou a capacidade do biocontrolador de hidrolisar o lipídio Tween 80.

### 2.2.7.2 Produção de compostos antimicrobianos

Foi avaliada a produção de alguns compostos antimicrobianos associados à antibiose (compostos tóxicos e ou com atividade inibitória como amônia, antibióticos e compostos voláteis) e à competição( produção de sideróforos).

#### a) Produção de sideróforos

Para avaliar a habilidade dos isolados biocontroladores em competir por  $Fe^{+3}$  utilizou-se o meio King B (KING, 1974) + azul de cromoazurol (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Os isolados biocontroladores foram semeados nas placas, incubados sob 28°C no escuro, por sete dias. A presença de um halo avermelhado ao redor das colônias indicou que o biocontrolador foi capaz de quelar  $Fe^{+3}$ . A avaliação desta capacidade foi quantitativa.

#### b) Produção de amônia

Para avaliação de produção de amônia os isolados biocontroladores foram repicados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido 523 (KADO; HESKETT, 1970) incubados em agitador orbital com agitação contínua. As avaliações foram efetuadas após 24 e 48 horas, retirando-se alíquotas de 1000  $\mu$ L dos cultivos aos quais foram adicionados 100  $\mu$ L de reagente de Nessler (MARIANO; SILVEIRA 2005). As avaliações foram qualitativas, observando-se a ocorrência (+) para aqueles isolados que formaram o precipitado amarelo alaranjado, ou não (-), para aqueles que mantiveram a coloração do meio.

#### c) Produção de compostos antibióticos hidrossolúveis

Realizou-se o teste de antibiose para observar um possível efeito antagonista dos isolados bacterianos sobre o fungo patogênico, *B. oryzae*, baseado na metodologia descrita por Romeiro (2007). Para tanto foi usado o meio BDA onde, foram semeados os isolados bacterianos, em riscas dispostas equidistantes, formando um quadrilátero.

No centro das placas foi depositado um disco de 5 mm de diâmetro, de meio contendo micélio de *B. oryzae*. O controle foi feito com uma placa contendo apenas o meio BDA e o disco com micélio do patógeno. As placas foram incubadas em sala de

incubação com fotoperíodo de 12h horas luz escuro a 24°C. Quando as testemunhas atingiram os bordos das placas foi realizada a avaliação.

A avaliação constituiu na observação da formação ou não de um halo de inibição entre o micélio do patógeno e as colônias bacterianas, utilizando-se paquímetro digital.

#### d) Produção de compostos antibióticos voláteis

Para observar se os isolados produziam compostos antimicrobianos voláteis, foram feitos testes utilizando placas de Petri descartáveis estéreis com divisória. Em uma das partes foi vertido meio 523 e na outra parte BDA.

No meio 523 foram semeados, os isolados bacterianos, e no lado que continha BDA foi disposto junto a divisória, um disco de 0,5 cm de diâmetro, contendo micélio do patógeno. As placas foram fechadas com o fundo de placas de Petri descartáveis estéreis normais e vedadas com fita adesiva. Foram feitas testemunhas para cada isolado bacteriano, em que o lado com BDA. não recebeu o micélio; e testemunhas para o fungo, no qual o lado em que havia meio 523 não recebeu o isolado bacteriano. As placas foram incubadas em sala de incubação com fotoperíodo 12 horas luz a 28°C.

A avaliação foi feita quando o crescimento fúngico, das placas testemunhas, atingiu o bordo da placa. Esta foi realizada mediante observação da formação de um halo de inibição formado entre o micélio do fungo e o bordo da placa.

## **2.2.8 Identificação dos antibióticos produzidos pelos isolados**

### 2.2.8.1 Extração do DNA

As bactérias foram repicadas em placas de Petri contendo meio 523 e incubadas durante 48h em BOD a 28°C. Essas foram suspendidas em água mili-Q e transferidas 2 mL para tubo de reação de 5 mL. Após centrifugados a 1800g, para o descarte do sobrenadante, o pellet formado foi ressuspendido com 480 µL de EDTA 500 mM e transferido para microtubos de 2 mL, onde foi novamente centrifugado durante 5 minutos a 1800g, e o sobrenadante foi removido. Posteriormente, extração foi realizada de acordo com o recomendado pelo fabricante do Kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA). As amostras de DNA foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose a 0,6%.

### 2.2.8.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de antibióticos

Para a detecção dos genes que codificam para a produção de antibióticos foram utilizados os seguintes primers: DAPG, PCA, PRN e PLT, que podem identificar os seguintes compostos antibióticos: 2,4-diacetylphloroglucionol, fenazina-1-carboxílico, pirrolnitrina e pioluteorin, respectivamente. O procedimento do PCR para cada primer foi feito de acordo com a tab. 2.

Tabela 2 – Primers e as condições de amplificação para a detecção, baseada em PCR, de diferentes de genes que codificam para os antibióticos (Adaptado de Raaijmakers et al., 1997 e Naik et al., 2008)

Gene e Primer	Sequência do primer	Tamanho fragmento (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
<b>PCA</b>			
PCA2a	5'-TGCCAAGCCTCGCT CCAAC-3'	1150	50°C
PCA3b	5'-CGCGTTGTTCTCGTTCAT-3'		
30-84/1	5'-CAGTTCATCCGGCGGGCTGCAG-3'	1200	61°C
30-84/2	5'-CCCGTTTCAGTAAGTCTTCATG- ATGCG-3'		
<b>DAPG</b>			
PhI2a	5'-GAGGACGTCGAAGACCACCA-3'	745	53°C
PhI2b	5'-ACC GCAGCATCGTGTATGAG-3'		
<b>PLT</b>			
PltBf	5'-CGGAGCATGGACCCCCAGC-3'	900	58°C
PltBr	5'-GTGCCCGATATTGGTCTTGACCG- AG-3'		
<b>PRN</b>			
Prncf	5'-CCACAA GCCCGGCCAGGAGC-3'	720	58°C
Prncr	5'-GAGAAGAGCGGGTCGATGAAGCC-3'		

A reação de PCR continha 13 µL total, onde 6,5 µL de GoTaq (Kit Promega®; 2 µL do primer R e F; 1 µL de DNA (100ng/µL) e 3,5 µL de água miliQ. A amplificação foi realizada em termociclador, utilizando temperatura de anelamento de acordo com cada primer. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X a 7 V cm<sup>-1</sup>. Como marcador de massa molecular foi utilizado o marcador 1KB Ludwig®. Para a visualização do amplicon, utilizou-se o corante Blue Green e a leitura feita em fotodocumentador.

## 2.3 Resultados

O uso dos isolados bacterianos no controle de *B. oryzae* mostrou-se eficiente apresentando variação entre as cultivares testadas. Por meio da análise de variância, pode-se observar que para os dois experimentos em casa de vegetação, realizados no intuito de reduzir a severidade de mancha parda em plântulas de arroz, houve interação entre as cultivares e os tratamentos bacterianos utilizados (tab.3).

Tabela 3 – Análise de variância mostrando o efeito da cultivar, tratamento bacteriano e suas interações sobre a área abaixo da curva do progresso da doença plântulas de arroz inoculadas em estágio V3 com *Bipolaris oryzae*, em dois anos de experimentos em casa de vegetação

Experimento	Cultivar	Tratamento Bacteriano	Interação	Coefficiente de Variação (%)
01	482,1387**	40,1581**	15,6572**	17,03
02	124,1920**	88,6983**	19,0392**	21,43

\*\*Significativo ao nível 1% de probabilidade, valores obtidos pelo teste F.

Observa-se que os tratamentos, comportaram-se de maneiras diferenciadas dependendo das cultivares utilizadas, sendo que no experimento de 2013 a cultivar BRS Atalanta apresentou menor severidade da doença em relação à testemunha, destacando-se os isolados DFs185 e DFs306. Todos os tratamentos apresentaram tendência a redução da severidade para a cultivar IRGA 427 (Quadro 01).

Quadro 1 – Área abaixo da curva do progresso da doença plântulas de arroz inoculadas em estágio V3 com *Bipolaris oryzae*, que tiveram suas sementes microbiolizadas com isolados bacterianos, cultivadas no ano de 2013 em casa de vegetação, climatizada

Cultivares	Tratamentos bacterianos						Testemunha
	DFs185	DFs223	DFs306	C01	C02	C03	
BRS Atalanta							16,60
BRS Querência							24,42
El Paso 144L							26,82
IRGA 427							1,00
Qualimax 1							19,82

■ Menor que a testemunha, mas sem diferença significativa;

■ Menor que a testemunha com diferença significativa;

□ Valores maiores que a testemunha.

No experimento de 2014, a cultivar BRS Pelota apresentou redução significativa da severidade da doença em todos os tratamentos bacterianos. Enquanto que o isolado DFs223 mostrou-se eficiente para todas as cultivares estudadas(Quadro 02).

Quadro 2 – Área abaixo da curva do progresso da doença de plântulas de arroz inoculadas em estágio V3 com *Bipolaris oryzae*, que tiveram suas sementes microbiolizadas com isolados bacterianos, cultivadas no ano de 2014 em casa de vegetação, climatizada

Cultivares	Tratamentos bacterianos						Testemunha
	DFs185	DFs223	DFs306	C01	C02	C03	
BRS Atalanta	■	■	■	■	■	■	99,75
BRS Pelota	■	■	■	■	■	■	138,25
BRS Querência	■	■	■	■	□	■	118,42
IRGA 420	□	■	■	■	■	■	72,63
IRGA 427	■	■	■	■	■	■	89,83

■ Menor que a testemunha, mas sem diferença significativa;

■ Menor que a testemunha com diferença significativa;

□ Valores maiores que a testemunha.

No ano de 2013, não foi possível fazer avaliação das duas doenças, mediante ao fato que não houve indícios do aparecimento de mancha parda na cultivar El Paso 144L, sendo avaliado apenas brusone. Nesse ano, a cultivar estudada apresentou uma redução na severidade de brusone (*P. grisea*), sendo que as combinações apresentaram os melhores resultados, em relação à testemunha (tab. 4).

Tabela 4 – Severidade de brusone (*Pyricularia grisea*), em estágio V6, de acordo com uma escala de notas, descrita por IRRI (1996), na cultivar El Paso 144L, em que as sementes foram microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos e BION, cultivadas no ano de 2013, na área experimental do IRGA em Torres, RS

Tratamentos Bacterianos	Severidade (nota)
DFs185	9,00 a
DFs223	9,00 a
DFs306	9,00 a
DFs185/306	9,00 a
DFs306/416	6,00 b
DFs185/306/416	5,00 b
BION	6,00 b
Testemunha	8,00 a

Médias seguidas de letras iguais de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ) ns: não significativo  $p \geq 0,05$ . Valores obtidos pelo teste F.

Já no experimento realizado em 2014, as condições ambientais permitiram o aparecimento das duas doenças, embora a severidade da doença tenha sido menor do que no ano de 2013 para a brusone. Observa-se que nenhum dos tratamentos bacterianos apresentou diferença significativa em relação à testemunha, para ambas as doenças avaliadas (tab. 5).

Tabela 5 – Severidade de brusone (*Pyricularia grisea*) e mancha parda (*Bipolaris oryzae*), em estágio V6, de acordo com uma escala de notas, descrita por IRRI (1996), na cultivar El Paso 144L, em que as sementes foram microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos e BION, cultivadas no ano de 2013, na área experimental do IRGA em Torres, RS

Doença	Severidade (nota)
Brusone	4,00 <sup>ns</sup>
Mancha parda	5,00 <sup>ns</sup>
Média	4,50

<sup>ns</sup>: não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Quando se utilizaram folhas destacadas para avaliar monociclo de *B. oryzae* não foi possível avaliar os resultados pois as folhas de arroz ainda muito tenras enrolaram não permitindo a visualização dos sintomas e sinais.

No entanto, quando se avaliou o monociclo em plantas, observou-se que os tratamentos bacterianos interferiam no desenvolvimento do patógeno, observou-se para o segundo ensaio que em todos os tratamentos o PI foi de 18 horas e o período de esporulação foi de 21 dias. No entanto, os tratamentos bacterianos interferiram na formação dos conídios de *B. oryzae*. Todos os tratamentos bacterianos reduziram a produção dos conídios. O tratamento com DFs306 se destacou reduzindo 43,75% e 42% na produção de esporos, no primeiro e segundo ensaio respectivamente (tab. 6). Não foi avaliado o número de lesões no primeiro ensaio pois a doença espalhou-se rapidamente pela folha não sendo possível realizar a contagem.

Tabela 6 – Contagem de conídios de *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz, desenvolvidas a partir de sementes de arroz (IRGA 420) que foram microbiolizadas com isolados bacterianos

Tratamentos	Contagem de conídios		Número de lesões/ folha
	Ensaio 01	Ensaio 02	
DFs185	7.04 b	6.20 b	7.50 <sup>ns</sup>
DFs223	6.50 b	8.87 b	8.00 <sup>ns</sup>
DFs306	4.83 b	6.12 b	4.25 <sup>ns</sup>
DFs185/DFs306	5.05 b	7.50 b	6.25 <sup>ns</sup>
DFs306/DFs416	7.41 b	8.25 b	8.25 <sup>ns</sup>
DFs185/306/416	7.75 b	6.00 b	9.50 <sup>ns</sup>
Testemunha	11.04 a	14.37 a	10.50 <sup>ns</sup>
C.V. (%)	31.82	32.36	33.00

Médias obtidas por meio das três contagens realizadas. As médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ) ns: não significativo  $p \geq 0,05$ . Valores obtidos pelo teste F.

Todas as bactérias produziram mais de um composto associado ao biocontrole. Por outro lado, não foi possível detectar produção de amilases (exceto DFs416), glucanases, pectinases e quitinases. O isolado DFs185 foi o que produziu maior diversidade de compostos considerados importantes para o controle biológico, apresentando atividade lítica para todos os compostos avaliados, exceto para os carboidratos, para os quais houve a hidrólise somente de celulose; seguido por DFs223, que apresentou as mesmas habilidade (para menos substratos), porém não

degradou celulose. Em contraste, para o isolado DFs306 foi observado apenas atividade proteolítica e produção de amônia (tab. 7)

Comportamento similar foi observado para a produção de antibióticos onde verificou-se que os isolados bacterianos produziram compostos hidrossolúveis e voláteis que inibiram o crescimento do patógeno (tab. 8), exceto, o isolado DFs306 (Fig. 01 A, B).

Tabela 7 – Produção de compostos associados ao biocontrole por isolados bacterianos

Compostos produzidos	DFs185	DFs223	DFs306	DFs416	Positivo	Negativo
Amilases*	-	-	-	1,28	1,97	-
Amônia	+	+	+	+	+	-
Caseínases*	2,02	-	-	2,86	1,19	-
Celulases*	0,43	-	-	2,11	1,60	-
Esculinases	+	+	+	+	+	-
Gelatinases	+	+	+	-	+	-
Glucanases	-	-	-	-	n.a**	n.a**
Lecitinases*	2,06	-	-	-	1,38	-
Lipases*	0,80	1,59	-	-	0,48	-
Quitinases	-	-	-	-	n.a**	n.a**
Pectinases	-	-	-	-	n.a**	n.a**
Síderoforos*	0,59	1,14	-	-	1,1	-

\*Halo formado ao redor da colônia, em centímetros. \*\* n.a: não avaliado. (+): presença de halo indicando produção do composto. (-): ausência de halo indicando não produção do composto.

Em relação aos testes *in vitro*, observamos que os isolados bacterianos produziram algum tipo de composto tóxico inibindo o desenvolvimento do patógeno (tab. 8), exceto, pelo isolado DFs306 que foi único que não inibiu o desenvolvimento do *B. oryzae*, como pode ser observado na Fig. 01 A, B.

Tabela 8 – Produção de compostos antibióticos hidrossolúveis e voláteis, pelos isolados bacterianos: DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificado) e DFs416 (*Bacillus* sp.) avaliados por pareamento de culturas e placas sobrepostas, respectivamente

Isolados bacterianos	Hidrossolúveis	Voláteis
DFs185	+	+
DFs223	+	+
DFs306	-	-
DFs416	+	+

(+): produção de composto; (-): ausência de produção de compostos.

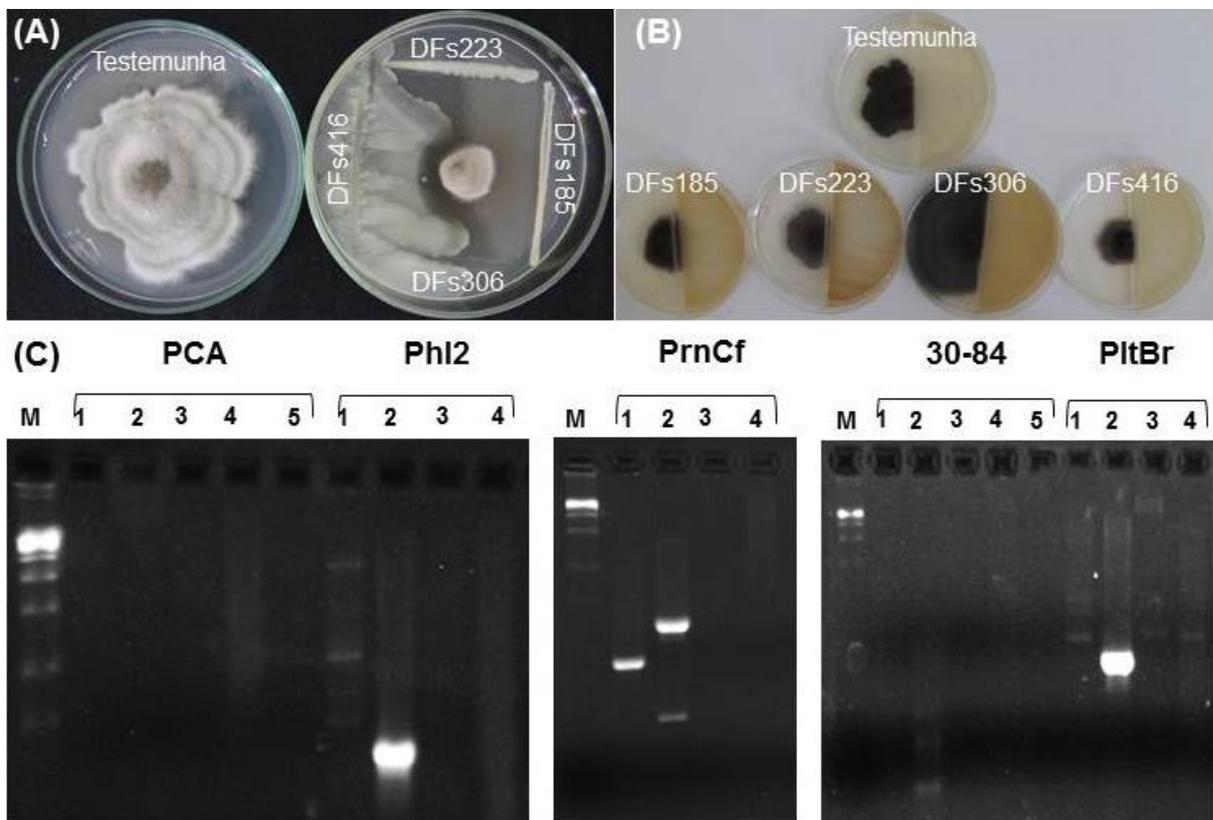


Figura 1 – Teste de antibiose para observação da produção de compostos antibióticos (A), e produção de compostos voláteis (B) produzidos pelos isolados bacterianos testados DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificado) e DFs416 (*Bacillus* sp.). Testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) (C) para a detecção de genes envolvidos na produção de antibiótico (M) marcador 1 kb (Promega); (1) *Pseudomonas synxantha* (DFs185); (2) *Pseudomonas fluorescens* (DFs223); (3) bactéria não identificada (DFs306); (4) *Bacillus* sp. (DFs416); (5) branco.

Por meio da reação em cadeia de polimerase, pode-se identificar quais os antibióticos os isolados bacterianos podem produzir. As espécies de *Pseudomonas* sp. (DFs185 e DFs223) amplificaram para a maioria dos primers (tab. 9).

Tabela 9 – Teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção de genes envolvidos na produção de antibióticos por *Pseudomonas synxantha* (DFs185), *Pseudomonas fluorescens* (DFs223), isolado não identificado (DFs306) e *Bacillus* sp. (DFs416)

Gene específico	Antibiótico	DFs185	DFs223	DFs306	DFs416
PCA	Ácido carboxílico-1-fenazina	-	-	-	-
30-84		-	-	-	-
PhI2	2,4-diacetil-floroglucinol	-	+	-	-
Plt	Pioluteorina	+	+	+	+
Prn	Pirrolnitrina	+	+	-	-

(+) presença (-) ausência do gene que amplifica para a produção do antibiótico.

Apesar do DFs306 não ter inibido o desenvolvimento do patógeno nos testes de antibiose (Fig. 01 AB), podemos (fig. 01 C) que este possui o gene para a produção do antibiótico pioluteorina (Plt).

A Fig. 01 C, mostra algumas bandas, no primer PhI2 para o isolado DFs185, mas estas foram consideradas, uma vez que essa amplificação foi inespecífica.

Os isolados bacterianos não apresentam o gene que amplifica para a fenazina, em nenhum dos dois primers (PCA e 30-84) utilizados. Por outro lado, houve amplificação do gene *plt* para todas as bactérias.

## 2.4 Discussão

O uso de bactérias biocontroladoras para redução da severidade de mancha parda em arroz irrigado mostrou-se eficiente como observado nos experimentos realizados em casa de vegetação (Quadros 01 e 02). Em ambos os experimentos as cultivares interagiram de maneira distinta em relação aos tratamentos bacterianos. Trabalhos que utilizaram somente tratamentos com isolados individualmente, enquanto o presente trabalho fez uso de combinações bacterianas, também mostraram que o controle da doença variou de acordo com a cultivar utilizada

(LUDWIG; MOURA, 2009). Estes autores observaram que a cultivar que apresentou maior controle da doença foi a BRS Pelota, o mesmo observado no presente trabalho, em que nesta cultivar se obteve redução em 37,03% a área abaixo da curva de progresso da severidade de mancha parda.

A interação observada entre as cultivares de arroz e tratamentos bacterianos é conhecida para uma diversidade de patossistemas, como o controle de *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum*, na cultura do algodão (LI et al., 2012), e de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijão (CORRÊA, 2007).

Apesar dos tratamentos bacterianos, em casa de vegetação, terem se comportado de maneira distinta, em ambos os ensaios, observou-se que as bactérias quando utilizadas isoladamente resultaram em controle significativo para um maior número de cultivares, apresentando, portanto maior estabilidade de controle. Souza-Júnior (2010), trabalhando com as mesmas bactérias utilizadas no presente trabalho, observou comportamento similar, ou seja, que combinando-se bactérias individualmente eficientes não resultam em aumento da eficiência de controle, embora o autor tenha verificado que o uso de combinações permitisse o controle de maior número de doenças, em outras palavras, houve aumento do espectro de ação. O aumento do percentual de controle devido ao uso de combinações também já é conhecido. Karthikeyan e Gnanamanickam (2008) observaram que isolados de *P. fluorescens* quando utilizados individualmente apresentaram pouco controle de brusone (*Magnaporthe grisea*) em *Setaria italica*, quando utilizados no campo. No entanto, quando esse isolado foi misturado a *Bacillus polymyxa* a supressão da doença aumentou para 88%. Comportamento similar foi apresentado no experimento de campo do presente trabalho, onde foi observado que os tratamentos constituídos de combinações (DFsDFs306/416; DFs185/306/416) apresentaram redução significativa na severidade de brusone.

Adicionalmente, o uso de combinações em campo resultou em controle similar ao composto químico avaliado no presente estudo (indutor de resistência Bion®). Efeito similar foi obtido utilizando-se espécies de *Bacillus* para o controle de ferrugem asiática em soja em condições de campo, em que, quando utilizados individualmente, não foram tão eficientes, porém, quando combinados, a eficiência no controle da doença assemelhou-se ao do controle químico (DORIGHELLO et al., 2015).

Em outro sentido, menor percentual de controle ou mesmo sua não ocorrência em campo também pode ocorrer. Este aspecto foi observado neste trabalho, quando as bactérias foram utilizadas isoladamente e apresentaram limitações no controle das doenças, sendo mais efetivas quando utilizadas em combinação (primeiro ano); ou não efetivas (segundo ano). Este fato pode ser explicado pela necessidade que as bactérias tem em se adaptar a diferentes ambiente em campo (microbiota nativa, pH do solo, etc), bem como às flutuações de umidade e de temperatura. O uso de combinações minimiza os problemas advindos destas limitações, pois, quando se tem mais de uma espécie de bactéria a probabilidade da sobrevivência de pelo menos uma delas no solo é aumentada. Além de que, cada espécie pode possuir características diferentes em relação aos mecanismos de ação, o que amplia as possibilidades de competição facilitando a supressão dos fitopatógenos (RAUPACH; KLOEPPER, 1998; BOER et al., 1999; AKHTAR; SIDDIQUI, 2009).

No entanto, no experimento de 2014, não se observou o controle das doenças avaliadas. Isso pode estar relacionado ao fato que o comportamento dos microrganismos é variável em condições de campo, pois estas estão expostas às diversidades do ambiente. Para se adaptar aos diferentes ambientes as bactérias possuem um mecanismo conhecido como quorum sensing que tem como função captar as informações do meio em que estão inseridas, comunicar-se com diferentes espécies, controlar sua densidade populacional e principalmente regular a sua expressão gênica, controlando processos celulares como a esporulação, formação de biofilmes, expressão de fatores de virulência, produção de bacteriocinas e antibióticos (VON BODMAN; BAUER; COPLIN, 2003; SALEH-LAKHA; GLICK, 2006). Mas para que isso aconteça é necessário que as bactérias atinjam alta concentração, sendo talvez esse fator que tenha influenciado na adaptação dos isolados usados em combinação nos experimentos de campo.

Os tratamentos bacterianos também agiram sobre o desenvolvimento de *B. oryzae*, apesar não ter atrasado o início da infecção (períodos de incubação e de esporulação) diminuíram a produção de esporos. Assim sendo, as bactérias estudadas são capazes de interferir em pelo menos um componente de resistência horizontal. Este comportamento pode ser explicado pela indução de resistência sistêmica já relatada para estas bactérias quando usadas individualmente (LUDWIG; MOURA, 2009; SCHAFFER, 2011) e em combinações (DFs185/306/416) (SCHAFFER,

2011) devido ao aumento das atividades de catalases e/ou peroxidases para o controle da mancha parda e escaldadura do arroz. As avaliações *in vitro* mostraram que todos os isolados produzem algum tipo de substância com efeito supressor sobre o patógeno, podendo atuar por antibiose e parasitismo, e que os isolados de *Pseudomonas* (DFs185 e DFs223) podem também competir por ferro. Os isolados DFs185 e DFs223, se destacaram com produção de maior diversidade de compostos. Esses isolados são espécies de *Pseudomonas* conhecidas na literatura pela sua alta capacidade antimicrobiana e/ou supressão de doenças, sendo consideradas excelentes biocontroladoras (WELLER, 2007; DE LA FUENTE et al., 2006; LAGZIAN et al., 2013; SINGH et al., 2013). Todas bactérias estudadas apresentaram pelo menos um gene relacionado à produção de algum tipo de antibiótico. Por outro lado, o isolado DFs306 não apresentou atividade inibitória sobre o crescimento micelial de *B. oryzae*, mas o gene *plt* que codifica para o antibiótico pioluteorina foi amplificado a partir do DNA desta bactéria. Esta aparente discrepância pode ser explicado pela expressão gênica, e portanto a produção do composto, ser dependente das condições do meio. Alguns antibióticos somente são produzidos em condições específicas e pode ser isso o que acontece para o isolado DFs306.

Os isolados de *Pseudomonas* apresentaram maior diversidade de antibióticos produzidos. O isolado de *P. fluorescens* (DFs223) único que possui o gene *phl2* para a produção 2,4-diacetil-floroglucinol (DAPG) cuja produção já foi associada ao controle de vários patógenos (SHANAHAN et al. 1992; KUMMAR et al., 2004; HAAS; DÉFAGO, 2005; WELLER, 2007). No entanto, não houve amplificação para nenhuma das bactérias quando se utilizou os primers específicos do gene *pca* que codifica para ácido carboxílico-1-fenazina. Em compensação há vários relatos ligando a produção de fenazinas e DAPG à supressão de doenças por *Pseudomonas* (THOMASHOW; WELLER, 1988; De SOUZA et al, 2003; MAZURIER et al, 2009). A não amplificação dos primers usados para fenazinas não implica necessariamente no fato destas bactérias não produzirem estes compostos. Esta formação pode ser explicada pela existência de diversidade deste grupo de antibióticos, não tendo os primers usados tamanha amplitude de detecção.

Os isolados DFs185, DFs223 e DFs416 produziram ainda compostos voláteis tóxicos ao patógeno. Nesse estudo não se determinou quais os voláteis poderiam ser produzidos, mas Hernández-León et al. (2015) detectaram a produção de voláteis a

base de aldeídos, cetonas, álcoois e derivados de enxofre como, metanotiol, sulfureto de dimetilo e trissulfureto de dimetilo (DMDS). Este último tem sido associado com atividade antifúngica e proteção de plantas, agindo também como um fator que desencadeia a resistência sistêmica induzida em plantas (HUANG et al., 2012). No entanto, a maioria dos estudos com voláteis são voltados ao biocontrole de doenças de pós-colheita (FRANCESCO et al., 2015), ou mesmo o comportamento fungistático como o DMDS que inibiu a germinação de esporos de fungos biocontroladores como *Paecilomyces lilacinus*, *Pochania chlamydospora* e *Chlonostachys rosea* (CHUANKUN et al., 2004). Poucos trabalhos buscam efeitos sobre patógenos habitantes do solo, neste sentido foi mostrado que DMDS pode reduzir o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* causador do mofo branco em diversas espécies cultivadas (FERNANDO et al., 2005). Não há conhecimento de trabalhos mostrando o efeito de voláteis sobre *B. oryzae*, embora seja sabido que compostos voláteis podem inibir o crescimento micelial de *B. sorokiniana* (MINOTTO, 2014).

Finalmente, este trabalho reafirma a importância de se conhecer o comportamento dos biocontroladores quando utilizados em diferentes genótipos de uma dada planta hospedeira, bem como os mecanismos envolvidos no biocontrole. Neste sentido foi mostrado que embora nem sempre as combinações sejam os tratamentos mais eficientes, em condições de campo estas podem superar condições variáveis e adversas do ambiente, resultando em um controle efetivo, principalmente quando estas são compostas por bactérias que atuam por diferentes mecanismos de ação, produzindo uma diversidade de compostos relacionados ao biocontrole.

## 2.5 Conclusões

As bactérias biocontroladoras DFs185, DFs223 e DFs306 se destacaram no controle da mancha parda em cultivares de arroz;

As cultivares BRS Atalanta e BRS Pelotas tiveram melhor estabilidade em relação ao uso das bactérias biocontroladoras;

As bactérias biocontroladoras apresentam comportamento diverso em condições controladas e em campo;

Todas as bactérias biocontroladoras veiculadas pela microbiolização das sementes atuam sobre a produção de esporos de *Bipolaris oryzae* nas folhas;

Os isolados bacterianos DFs185, DFs223, DFs306 e DFs416 produzem uma diversidade de compostos associados ao biocontrole.

### **3. CAPÍTULO II – Bactérias promotoras de crescimento em diferentes cultivares de arroz**

#### **3.1 Introdução**

O arroz é um alimento base na nutrição humana sendo consumido por mais da metade da população mundial (YOUNG; PELLET, 1997). O Brasil figura como um dos principais produtores mundiais de arroz, produzindo 12.185,7 mil toneladas (CONAB, 2014), apresentando consumo anual de 52,5 kg/hab (FAO, 2015).

O estado do Rio Grande do Sul destaca-se como maior produtor nacional de arroz, produzindo 8.112,9 mil toneladas (CONAB, 2014). No entanto, a produtividade média no estado ( $7.450 \text{ kg ha}^{-1}$ ) ainda é considerada baixa, fato que pode estar relacionado à baixa fertilidade dos solos, uma vez que a cultura do arroz necessita de grandes quantidades de nutrientes para o seu crescimento, desenvolvimento e produção. Um exemplo disso, é que para a produção de uma tonelada de grãos de arroz são necessários aproximadamente 32 a 47 kg de nitrogênio por hectare (CHOUDHURY; KENNEDY, 2004). Sendo assim, este é o elemento químico mais consumido pela planta, podendo ser um fator limitante na produtividade, quando áreas de cultivos apresentam deficiência desse nutriente, como os solos brasileiros (RAVEN; RAY; SUSAN, 1992).

Para superar essa deficiência são realizadas aplicações de fertilizantes a base nitrogênio orgânico ou químico (TURNER et al., 2013). Essas aplicações, quando em excesso, podem prejudicar o desenvolvimento da planta (KENNEDY et al., 2004), causando um maior crescimento da parte aérea, permitindo que os tecidos fiquem mais suculentos ou flácidos, favorecendo o ataque de fitopatógenos (SOUZA; CARVALHO, 2000). A adubação nitrogenada também pode provocar danos ao ambiente, como: contaminação de lençóis freáticos por  $\text{NO}_3$ , acidificação do solo e

aumento da taxa de desnitrificação, resultando no aumento da emissão de  $N_2O$  para a atmosfera (BISWAS et al., 2000; KENNEDY et al., 2004).

Com o intuito de reverter esse quadro, buscam-se outros processos que sejam capazes de fornecer nitrogênio ao arroz, que não causem danos ao meio ambiente e que tenham menores custos de produção (GUIMARÃES; BALDANI; BALDANI, 2003).

Dentre essas alternativas está o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, conhecidas como PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*), que quando associadas com uma planta hospedeira estimulam o crescimento destas (VESSEY, 2003; HAYAT et al., 2010). Estes micro-organismos são associados com a rizosfera, que compreende a zona estreita do solo em torno da raiz, estando sob influência do sistema radicular (DOBBELAERE et al., 2003), formando um nicho ecológico (HAYAT et al., 2010). Neste sistema, a rizosfera fornece energia e nutrientes para as PGPR, enquanto estas excretam metabólitos na rizosfera que são utilizados pelas plantas (VAN LOON, 2007).

A partir dessa interação as PGPR podem, além de aumentar o crescimento das plantas, acelerar a germinação das sementes, melhorar a emergência, como também proteger as plantas contra o ataque de fitopatógenos (LUGTENBERG; CHIN-A-WOENG; BLOEMBERG, 2002). Os mecanismos de ação envolvidos nesses processos podem ser diretos como o aumento na disponibilidade de nutrientes para a planta por meio da fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e produção de sideróforos (SELOSSE et al., 2004; VEGA et al., 2007). Outro mecanismo direto que está associado a promoção de crescimento é a capacidade das bactérias produzirem enzimas como 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase (FORCHETTI et al., 2007).

Dentre os mecanismos indiretos compreendem a proteção contra fitopatógenos por meio da competição, produção de sideróforos, antibiose (GLICK; PASTERNAK, 2003) e indução de resistência sistêmica (TUZUN; KLOPPER, 1994).

Gêneros bacterianos que possuem a capacidade de produzir enzimas, como ACC deaminase, agem positivamente na promoção do crescimento de plantas, principalmente em ambientes que passam por algum tipo de stress (CHENG et al., 2007). Alguns trabalhos mostram que as bactérias com capacidade de produzir ACC deaminase e sideróforos, ajudam na germinação de arroz em solos salinos (BAL et al., 2013).

Vários gêneros bacterianos vêm sendo relatados como detentores de propriedades que promovem o crescimento de plantas como as *Pseudomonas* (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2006; YAO et al., 2010), *Azospirillum* (MALIK et al. 1997; AMBROSINI et al. 2012), *Bacillus* (ÇAKMAKÇI et al., 2007; BENEDEZI et al. 2008), *Burkholderia* (AMBROSINI et al. 2012; FARINA et al. 2012), *Enterobacter* (AMBROSINI et al. 2012) e *Rhizobium* (WANG; MARTINEZ-ROMERO, 2000). Espécies desses gêneros bacterianos estão sendo utilizados como inoculantes ou biofertilizantes, com o intuito de desenvolver um sistema sustentável de produção, sem causar danos ao meio ambiente e mantendo a produtividade elevada (YANNI; DAZZO, 2010).

Trabalhos mostram que os isolados de *Pseudomonas synxantha*, *P. fluorescens* e de *Bacillus* sp. Promovem o crescimento de plantas de arroz, além de controlar doenças como queima das bainhas e reduzir a reprodução de *Meloidogyne graminicola* (SOUZA-JÚNIOR et al., 2010). No entanto pouco se conhece a respeito desses isolados agirem com dupla finalidade.

Mediante ao exposto, o objetivo deste trabalho foi observar o efeito de diferentes tratamentos bacterianos, isolados ou em combinação, no desenvolvimento de diferentes cultivares de arroz irrigado; e identificar os mecanismos de ação que podem estar envolvidos na promoção de crescimento das plantas.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Promoção de crescimento em casa de vegetação**

#### **3.2.1.1 Isolados bacterianos e tratamentos utilizados**

Os isolados bacterianos utilizados são pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas. Estes isolados foram isolados por Moura e colaboradores em 1997 (MOURA et al., 1998) e selecionadas por Ludwig et al., (2009) e suas combinações por Souza-Júnior (2010). Os isolados bacterianos utilizados foram: DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificada) e DFs416 (*Bacillus* sp.), sendo estes utilizados individualmente (DFs185, DFs223 e DFs306) ou em combinação: C01 (DFs185 + DFs306), C02 (DFs306 + DFs416) e C03 (DFs185 + DFs306+ DFs416), e como controle utilizou-se solução salina (NaCl 0.85).

### 3.2.1.2 Cultivares de arroz utilizadas

Para a condução do experimento foram utilizadas 11 cultivares de arroz recomendadas para o plantio no estado do Rio Grande do Sul, descritas na tab. 10.

Tabela 10 – Descrição das cultivares utilizadas na condução dos experimentos

Cultivar	Instituição detentora	Ciclo*	Altura (cm)	Tipo de grão
BRS Atalanta	Embrapa	Médio-precoce	71	Longo Fino
BRS Pampa	Embrapa	Precoce	95,6	Longo Fino
BRS Querência	Embrapa	Precoce	87	Longo Fino
BRS Sinuelo	Embrapa	Médio	94,3	Longo Fino
El Paso 144L	-	Médio		Longo Fino
Epagri 109	Epagri	Tardio	90	Longo Fino
IRGA 420	IRGA	Médio	80	
IRGA 423	IRGA	Precoce	84	Longo Fino
IRGA 424	IRGA	Médio	80	Longo Fino
IRGA 426	IRGA	Médio	90	Longo Fino
IRGA 427	IRGA	Médio	90	Longo Fino
Qualimax 1	Aventis	Médio		Longo Fino

**MP:** médio-precoce, 90-100 dias; **P:** precoce, 100-120 dias; **M:** médio, 120-130 dias. Fonte: SOSBAI (2010; 2012; 2014)

### 3.2.1.3 Preparo das suspensões e microbiolização das sementes

Os isolados bacterianos foram repicados para placas de Petri contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e incubados a 28°C por 48 horas. Após o crescimento destas, foi adicionada solução salina (NaCl 0,85%) às colônias formadas, para obtenção das suspensões as quais, posteriormente foram ajustadas em espectrofotômetro para  $A_{540}=0,5$  (correspondendo a  $10^8$  unidades formadoras de colônias). As combinações foram obtidas a partir de suspensões dos isolados preparados individualmente e com as concentrações ajustadas, misturadas em volumes iguais.

As sementes de arroz foram imersas, nas suspensões bacterianas, sob agitação durante 30 minutos, a 10°C. As sementes que foram imersas somente em solução salina, consistiram no tratamento testemunha.

#### 3.2.1.4 Condução do experimento

O experimento para verificar a promoção de crescimento das plantas foi conduzido em casa de vegetação climatizada. As unidades experimentais (u.e.) foram constituídas por copos plásticos com capacidade de 750 mL, que foram cheios com solo de várzea, classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico solódico (STRECK et al., 2002).

Todas as sementes, de todas as cultivares foram microbiolizadas, como descritas no item 3.2.1.3. Imediatamente após foram mantidas em gelo até o momento de serem semeadas. Cada u.e. recebeu cinco sementes. Com 21 dias (estágio V3 da escala de Counce et al., 2000) após a semeadura foram realizadas as avaliações. A altura das plantas foi medida utilizando-se régua milimetrada. Foi contado o número de folhas, As folhas foram então cortadas rente ao solo usando uma tesoura. As folhas foram, colocadas em sacos de papel e levadas à estufa de ar forçado para secagem a 70°C até peso constante. Para determinação da massa seca parte aérea as folhas secas foram pesadas em uma balança de precisão.

Os ensaios foram realizados em cinco épocas ao longo de dois anos. Nas três primeiras épocas foram semeadas 11 cultivares (exceto IRGA 420). Para as duas últimas épocas semeadas as três cultivares que obtiveram melhor desempenho nos tratamentos bacterianos, bem como a cultivar IRGA 420 em substituição a El Paso 144L como suscetível a doenças do arroz (ambos realizados em dezembro de 2013).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado contendo quatro repetições, arranjados em esquema fatorial 11 x 7, e depois 4 x 7, onde o fator A foi composto pelas cultivares de arroz irrigado (tab. 12) e o fator B constituído pelos tratamentos bacterianos (tab. 11).

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk ( $p \geq 0,05$ ), e quando necessário, realizou-se a transformação dos dados. Após, procedeu-se à análise de variância pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), e quando significativos, foi

realizada a comparação de médias dos tratamentos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ), pelo teste Scott-Knott, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7

### 3.2.2 Ensaio *in vitro*

#### 3.2.2.1 – Solubilização de fosfatos

Para avaliar a capacidade dos isolados de solubilizar fosfatos, foi utilizado o meio de cultura 1/10 TSA acrescido de  $\text{CaHPO}_4$ , preparado de acordo com Cattelan (1999).

O meio foi vertido nas placas 18 horas antes do uso e incubadas a  $28^\circ\text{C}$  visando a redução da umidade superficial, para evitar o espalhamento excessivo dos isolados de *Bacillus*. Nessas, foram semeadas em pequenos círculos (spots) as bactérias a serem avaliadas, sendo, então, incubadas em BOD a  $28^\circ\text{C}$  por 7 dias.

As avaliações consistiram na observação da presença de um halo claro ao redor das colônias bacterianas. Esses halos foram medidos com um paquímetro digital, em que os diâmetros das colônias ( $\emptyset C$ ) e dos halos formados ( $\emptyset H$ ) no meio de cultura em dois sentidos diametralmente opostos, utilizando-se paquímetro digital. Nesse caso, os resultados foram expressos como diâmetro relativo de halo ( $\emptyset RH$ ) calculado pela equação 3.

$$\emptyset RH = (\emptyset H - \emptyset C) / \emptyset C. \text{ [eq.3]}$$

Para a realização desse teste foram utilizadas seis repetições, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado.

#### 3.2.2.2 – Produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase

Com o objetivo de avaliar se os isolados bacterianos possuem a capacidade de produzir a enzima ACC deaminase, utilizou-se o teste descrito por Cattelan (1999). Foram utilizados dois meios de MLN (meio semi-sólido livre de nitrogênio), sendo um com a presença de ACC e outro sem ACC. Foram vertidas duas placas de cada meio 18 horas antes do uso, conforme descrito anteriormente. Em cada placa foram semeadas em spots, as bactérias a serem avaliadas. Estas foram incubadas em BOD

a 28°C por 7 dias. Os isolados que cresceram no meio com ACC foram transferidos para uma nova placa com meio ACC e incubados novamente. Foi feita uma placa controle positivo, os isolados semeados individualmente em meio 523 foram utilizados como controle positivo.

Os isolados que cresceram bem na segunda transferência no meio com ACC, e que não apresentaram bom desenvolvimento no meio sem ACC, foram capazes de utilizar ACC como única fonte de N, e, portanto, são produtoras de ACC deaminase.

### 3.2.2.3 Produção de sideróforos

Para avaliar a habilidade dos isolados biocontroladores em competir por  $Fe^{+3}$  utilizou-se o meio King B + azul de cromoazurol (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Os isolados bacterianos foram semeados nas placas, incubados a 28°C, por sete dias. A presença de um halo avermelhado ao redor das colônias indicou que o isolado foi capaz de quelar  $Fe^{+3}$ . Esses halos foram medidos com um paquímetro digital.

### 3.2.2.4 Colonização de raízes

Para realização do teste da colonização de raízes sementes das cultivares foram desinfestadas superficialmente, sequencialmente em uma solução de álcool 70% por cinco minutos, hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos e então lavadas três vezes em água destilada autoclavada. Posteriormente as sementes foram colocadas em Erlenmeyers de 125 mL de capacidade, onde receberam as suspensões bacterianas, preparadas conforme descrito no item 2.2.3. As sementes foram microbiolizadas sob agitação durante 30 minutos a 10°C.

Posteriormente, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio phytigel, sendo estes devidamente identificados e distribuídos casualmente em duas estantes, e incubados em sala de crescimento sob fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro a  $24\pm 2^\circ C$ , durante 14 dias.

A avaliação foi realizada pela observação da presença ou não de turvação do meio ao redor das raízes.

### 3.3 Resultados

A microbiolização das sementes com tratamentos bacterianos visando à promoção de crescimento de cultivares de arroz irrigado mostrou-se efetiva variando de acordo com a cultivar e a variável resposta, apresentando interação significativa entre os fatores analisados (tab. 11).

Tabela 11 – A de variância mostrando o efeito da cultivar, tratamento bacteriano e suas interações sobre o número de folhas, altura e massa seca de parte aérea de plantas de arroz

Experimento	Cultivar	Tratamento Bacteriano	Interação	Coefficiente de variação (%)
Número de folhas				
01	31,3054**	0,6815 <sup>ns</sup>	4,0610**	14,95
02	24,4122**	1,9761 <sup>ns</sup>	3,7837**	20,19
03	30,0782**	3,0877**	5,97**	6,54
04	1,3536 <sup>ns</sup>	46,4289**	4,4980**	14,64
05	54,6969**	2,4777*	3,5791**	12,30
Altura (cm)				
01	23,4107**	3,57**	5,6201**	7,65
02	36,2442**	3,5798**	4,6672**	10,02
03	40,1492**	9,9504**	8,6793**	7,97
04	9,7572**	16,5515**	2,0148*	5,47
05	67,2388**	0,9962 <sup>ns</sup>	2,4275**	13,49
Massa Seca de Parte Aérea (g)				
01	8,7927**	0,9398 <sup>ns</sup>	2,1969**	15,81
02	8,8232**	1,5709 <sup>ns</sup>	1,5850**	22,84
03	6,6160**	1,7171 <sup>ns</sup>	3,3573**	18,52
04	7,1472**	24,3725**	2,7107**	19,23
05	77,3426**	1,5261 <sup>ns</sup>	3,6469**	2,26

\*Significativo ao nível 5% de probabilidade; \*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns: não significativo  $p \geq 0,05$ . Valores obtidos pelo teste F.

A cultivar BRS Querência apresentou melhor resposta ao uso dos tratamentos bacterianos, tendo um comportamento estável entre as variáveis respostas e repetitividade dentre os cinco ensaios (Quadro 03, 04, 05). Apesar de apresentar o mesmo comportamento, para todas às variáveis respostas, a cultivar Epagri 109 foi a que conseguiu manter uma estabilidade de efeitos benéficos, em relação às demais cultivares avaliadas (Quadro 03, 04, 05), seguido pelas cultivares BRS Atalanta e IRGA 424. A cultivar IRGA 427, apresentou comportamento estável durante os cinco experimentos, porém não foram efeitos significativos.

Os tratamentos bacterianos que se destacaram nas avaliações das três variáveis respostas e mantiveram estabilidade entre as diferentes cultivares de arroz foram os tratamentos: DFs185, DFs223 e DFs306. Algumas combinações apresentaram diferença significativa em relação à testemunha como as C01 e C02, mas a ação destas não foi constante entre as cultivares, nem mesmo dentro da mesma cultivar, quando analisadas as variáveis respostas (Quadro 03, 04, 05). A combinação das três bactérias, C03, foi o tratamento que apresentou menos vezes efeito significativo no decorrer dos cinco ensaios,

O tratamento DFs185 aumentou em 52, 25 e 39% o número de folhas, altura e MSPA, respectivamente, sendo o melhor tratamento, seguido pelos tratamentos DFs223 e DFs306 (em relação aos cinco ensaios). Por outro lado, DFs223 foi o tratamento que resultou em efeitos benéficos significativos um maior número de vezes para cada uma das variáveis resposta, representando 31% das possibilidades (todas cultivares e cinco ensaios = 39) para número de folhas, 23% para altura e 18% para MSPA.

Em outro sentido, o número de folhas e altura das plantas foram as variáveis resposta mais impactadas pelos tratamentos bacterianos, ambos com efeitos positivos significativos em 18% das combinações cultivar X tratamento X ensaio (total de 234). Em contraste, MSPA apresentou uma percentagem de ocorrência de efeitos benéficos menor que 10%.

Os testes *in vitro* realizados para observar se os isolados possuíam a capacidade de produzir compostos responsáveis por desencadear a promoção de crescimento, mostraram, que com exceção do isolado DFs306, todos produzem pelo menos um composto (tab. 12).

Tabela 12 – Habilidades dos isolados bacterianos, DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificada) e DFs416 (*Bacillus* sp), relacionadas à promoção de crescimento

Isolados Bacterianos	Produção de sideróforo	Solubilização de fosfato	ACC* deaminase
DFs185	0,59	0,46	+
DFs223	1,14	0,54	-
DFs306	-	-	-
DFs416	-	0,51	+

(+): produção do composto (-): ausência de produção do composto.

\*ACC deaminase: 1-aminociclopropano-1-carboxilato

Os isolados bacterianos DFs185 e DFs416 cresceram em meio sólido, tendo ACC como única fonte de carbono e nitrogênio, indicando que ambos possuem a capacidade da produção da enzima ACC deaminase. Com exceção do isolado DFs306, todos os isolados solubilizaram fosfato. Os isolados DFs185 e DFs223, possuem também capacidade de competição, pois foram capazes de quelar  $Fe^{3+}$  (tab.12).

Foi possível observar a que todos os isolados bacterianos possuem a capacidade de colonizar as raízes de algumas das cultivares de arroz testado nos experimentos de casa de vegetação para observação da promoção de crescimento.

Quadro 3 – Quadro do número de folhas de cultivares de arroz irrigado que tiveram as sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, conduzidos em casa de vegetação climatizada e avaliada nos estágios V4 e V9 em cinco experimentos, em que (□) menor que a testemunha; (■) maior que a testemunha sem diferença estatística e (■) maior que a testemunha com diferença estatística

Cultivares	Isolados bacterianos						Test.
	DFs185	DFs223	DFs306	C01	C02	C03	
<b>Experimento 1</b>							
BRS Atalanta	■				■		3,75
BRS Pampa			■	■			3,25
BRS Querência	■	■	■				2,62
BRS Sinuelo							2,50
El Paso 144 L	■	■		■	■	■	3,12
EPAGRI 109	■			■		■	2,25
IRGA 423					■		3,50
IRGA 424	■	■		■			2,62
IRGA 426	■	■		■		■	2,87
IRGA 427		■		■			3,47
Qualimax 1		■		■			2,62
<b>Experimento 2</b>							
BRS Atalanta		■	■				2,50
BRS Pampa					■		3,98
BRS Querência	■	■				■	2,25
BRS Sinuelo							2,88
El Paso 144 L	■	■		■		■	3,50
EPAGRI 109						■	3,63
IRGA 423							4,13
IRGA 424	■		■	■		■	2,88
IRGA 426		■		■			2,75
IRGA 427	■	■		■		■	2,25
Qualimax 1	■	■		■			2,50
<b>Experimento 3</b>							
BRS Atalanta			■	■			2,38
BRS Pampa		■					3,13
BRS Querência	■	■		■			1,48
BRS Sinuelo							2,53
El Paso 144 L							3,63
EPAGRI 109		■	■	■	■	■	2,13
IRGA 423		■			■		2,98
IRGA 424			■	■			3,15
IRGA 427							3,38
<b>Experimento 4</b>							
BRS Atalanta	■	■	■				3,75
BRS Querência	■	■	■	■			4,33
IRGA 420			■	■	■		3,47
IRGA 427							5,97
<b>Experimento 5</b>							
BRS Atalanta					■	■	3,78
BRS Querência	■	■	■	■	■	■	3,93
IRGA 420	■	■	■	■	■	■	5,03
IRGA 427							3,50

Médias calculadas pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), dentro de cada experimento.

Quadro 4 – Quadro da altura de cultivares de arroz irrigado que tiveram as sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, conduzidos em casa de vegetação climatizada e avaliada nos estágios V4 e V9 em cinco experimentos, em que (□) menor que a testemunha; (■) maior que a testemunha sem diferença estatística e (■) maior que a testemunha com diferença estatística.

Cultivares	Isolados bacterianos						Test.
	DFs185	DFs223	DFs306	C01	C02	C03	
<b>Experimento 1</b>							
BRS Atalanta	■	■	□	■	■	■	16,73
BRS Pampa	□	□	□	□	□	□	17,38
BRS Querência	□	□	■	□	□	□	17,13
BRS Sinuelo	□	□	□	□	□	□	17,00
EI Paso 144 L	□	□	□	□	□	■	16,18
EPAGRI 109	■	■	■	■	■	■	12,05
IRGA 423	□	□	■	□	■	□	17,54
IRGA 424	■	■	■	■	■	■	11,55
IRGA 426	■	■	■	■	■	■	12,90
IRGA 427	□	■	■	□	■	□	15,98
Qualimax 1	■	■	□	□	□	■	13,36
<b>Experimento 2</b>							
BRS Atalanta	□	□	□	■	□	□	15,94
BRS Pampa	□	□	■	□	□	□	29,94
BRS Querência	■	■	□	□	■	□	16,23
BRS Sinuelo	□	□	□	□	□	□	17,90
EI Paso 144 L	■	□	□	□	□	□	25,48
EPAGRI 109	□	□	□	□	□	■	26,52
IRGA 423	□	■	□	□	□	□	28,17
IRGA 424	□	□	■	■	■	■	17,92
IRGA 426	■	■	■	■	■	■	13,60
IRGA 427	■	■	■	■	■	□	14,75
Qualimax 1	■	□	■	□	□	□	20,70
<b>Experimento 3</b>							
BRS Atalanta	□	□	■	□	■	□	14,08
BRS Pampa	□	□	□	□	□	□	18,00
BRS Querência	■	■	■	□	□	□	7,28
BRS Sinuelo	□	□	□	□	□	□	16,95
EI Paso 144 L	□	□	□	□	□	□	20,13
EPAGRI 109	□	■	■	■	■	■	11,05
IRGA 423	■	■	■	■	■	□	13,25
IRGA 424	□	□	□	■	■	□	13,00
IRGA 427	□	□	□	□	□	■	14,35
<b>Experimento 4</b>							
BRS Atalanta	■	■	■	□	□	□	24,19
BRS Querência	■	■	■	■	■	■	20,20
IRGA 420	■	■	□	□	□	□	23,65
IRGA 427	■	■	□	□	□	□	24,39
<b>Experimento 5</b>							
BRS Atalanta	□	□	□	□	□	■	24,11
BRS Querência	■	■	■	■	■	■	27,31
IRGA 420	■	■	■	■	■	■	29,66
IRGA 427	□	□	□	□	□	□	18,92

Quadros pretos correspondem a médias que diferiram da testemunha pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).  
 Dados foram transformados por:  $(\sqrt{x - 1})$

Quadro 5 – Quadro da massa seca de parte aérea de cultivares de arroz irrigado que tiveram as sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, conduzidos em casa de vegetação climatizada e avaliada nos estágios V4 e V9 em cinco experimentos, em que (□) menor que a testemunha; (■) maior que a testemunha sem diferença estatística e (■) maior que a testemunha com diferença estatística.

Cultivares	Isolados bacterianos						Test.
	DFs185	DFs223	DFs306	C01	C02	C03	
<b>Experimento 1</b>							
BRS Atalanta	■	■	□	■	■	■	0,051
BRS Pampa	■	□	□	□	□	□	0,047
BRS Querência	■	■	■	□	□	□	0,033
BRS Sinuelo	□	□	□	□	■	□	0,054
Ei Paso 144 L	□	□	□	■	■	□	0,063
EPAGRI 109	□	□	□	■	□	□	0,045
IRGA 423	□	□	■	□	□	□	0,072
IRGA 424	□	□	□	□	□	□	0,027
IRGA 426	■	■	■	□	■	■	0,028
IRGA 427	□	■	■	□	□	□	0,055
Qualimax 1	■	□	■	■	□	□	0,042
<b>Experimento 2</b>							
BRS Atalanta	■	■	□	■	■	□	0,039
BRS Pampa	□	□	□	□	□	□	0,072
BRS Querência	■	■	□	■	■	□	0,036
BRS Sinuelo	■	□	□	□	□	□	0,046
Ei Paso 144 L	■	□	□	■	■	■	0,088
EPAGRI 109	□	■	□	□	□	■	0,079
IRGA 423	■	□	□	■	■	□	0,084
IRGA 424	■	□	■	□	■	■	0,059
IRGA 426	■	■	■	□	■	□	0,025
IRGA 427	■	■	■	■	■	□	0,046
Qualimax 1	□	□	□	□	□	□	0,063
<b>Experimento 3</b>							
BRS Atalanta	□	□	■	□	■	□	0,030
BRS Pampa	□	■	□	□	□	□	0,037
BRS Querência	■	■	■	□	■	■	0,017
BRS Sinuelo	□	□	□	□	□	□	0,054
Ei Paso 144 L	□	□	□	□	□	□	0,056
EPAGRI 109	□	□	□	□	■	□	0,040
IRGA 423	■	■	■	□	■	□	0,022
IRGA 424	□	□	□	□	□	□	0,035
IRGA 427	■	□	□	□	□	■	0,028
<b>Experimento 4</b>							
BRS Atalanta	■	■	■	□	□	□	0,050
BRS Querência	■	■	■	■	■	■	0,049
IRGA 420	■	■	□	□	□	□	0,074
IRGA 427	■	■	■	□	□	□	0,102
<b>Experimento 5</b>							
BRS Atalanta	□	□	□	□	□	■	0,063
BRS Querência	■	■	■	■	■	■	0,091
IRGA 420	■	■	■	■	■	■	0,136
IRGA 427	□	□	□	□	□	□	0,057

Quadros pretos correspondem a médias que diferiram da testemunha pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).  
 Dados foram transformados por:  $(\sqrt{x - 0,01})$

### 3.4 Discussão

A microbiolização das sementes de arroz irrigado com diferentes isolados bacterianos, usados individualmente ou em combinação foi eficiente em promover o crescimento de plantas, porém, as cultivares responderam de maneira diferente aos tratamentos bacterianos, demonstrando que há uma interação entre as cultivares e os tratamentos utilizados. Este fato corrobora com os encontrados por Ferreira et al. (2014) no qual os autores também observaram que cultivares de arroz interagem de maneira distinta de acordo com o tratamento bacteriano utilizado na microbiolização das sementes.

A cultivar BRS Querência apresentou maior estabilidade no efeito em relação às demais cultivares utilizadas, apresentando respectivamente incrementos de 46 e 51% na altura de plantas e massa seca de parte aérea (MSPA). Ganhos dessa ordem foram observados por Jha et al. (2009) que em estudo semelhante observaram que o uso de bactérias promotoras de crescimento foi responsável por um aumento de 60% no crescimento de parte aérea das plantas de arroz. Esses acréscimos, nas variáveis respostas, que refletem na promoção de crescimento das plantas, estão muito acima dos encontrados por Ferreira et. al (2014) em que as cultivares de arroz apresentaram um aumento de 9,3% na altura de plantas e 8,8% na massa fresca da parte aérea em relação ao controle. Essa variação, entre os dois estudos, pode estar relacionada ao uso de cultivares e isolados diferentes, bem como ao ambiente em que eles estão inseridos, sofrendo influência da temperatura, tipo e pH do solo, e principalmente das relações dos isolados com a microbiota nativa do solo (GOLDFARB et al., 2011).

Portanto, um fator que deve ser levado em consideração é a capacidade dos isolados bacterianos em colonizar as raízes e persistir na rizosfera, uma vez que esta característica pode variar em função da cultivar (YANNI et al., 1997; ETESAMI et al., 2014). Esse fator foi apresentado pelos isolados deste estudo, pois foram capazes de crescer em meio sem nenhuma fonte de carbono e nitrogênio, mostrando capacidade de utilizar os exsudatos radiculares para suprir esta deficiência. A capacidade de colonizar as raízes *in vitro*, evidencia seus potenciais de competição seja por espaço ou por nutrientes, permitindo o estabelecimento da população promotora do crescimento de plantas (WEYENS et al., 2009).

Um fator de competição, associado à capacidade de isolados bacterianos em promover crescimento é a produção de sideróforos (RACHID; AHMED, 2005) Os

isolados DFs185 e DFs223 apresentaram essa característica podendo, esta, ter contribuído para o desenvolvimento das plantas de arroz, uma vez que são estes os tratamentos de melhor desempenho para a maioria das cultivares testadas, e em todas as variáveis respostas analisadas. Vários estudos têm mostrado que diversos gêneros bacterianos responsáveis por promover o crescimento de planta produzem algum tipo de sideróforo (SHAHI et al., 2011; BENEDUZI et al., 2013).

A capacidade dos isolados bacterianos em produzir a enzima ACC deaminase é outro fator importante que pode ter auxiliado na promoção do crescimento das plantas de arroz, pois foi sintetizado pelos isolados DFs185 e DFs416. Trabalhos mostram que bactérias como *Serratia* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., que produzem ACC deaminase promovem o crescimento de cultivares de arroz (ETSAMI et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; SARATHAMBAL et al., 2015). Isso ocorre porque a ACC deaminase atua na redução dos níveis de etileno na planta (GLICK; PENROSE; LI, 1998; GLICK, 2014). Alguns trabalhos também tem relatado a capacidade das bactérias que produzem essa enzima em promover a germinação das plantas em condições de stress como inundação, salinidade e seca (MAYAK; TIROSH; GLICK, 2004).

Outro fator que pode ter influenciado no desenvolvimento das plantas é capacidade que todos os isolados bacterianos, exceto DFs306, apresentaram para solubilizar fosfato, podendo propiciar a disponibilidade de fósforo solúvel (KUKINSKY-SOBRAL et al., 2004). Trabalhos mostram que diversos gêneros bacterianos possuem essa habilidade, principalmente espécies de *Bacillus* (WANI et al., 2007; ISLAM et al., 2009; SARATHAMBAL et al., 2015).

Os tratamento bacterianos que se destacaram foi o DFs185 e DFs223, identificados como duas espécies de *Pseudomonas*, gênero que apresenta características fisiológicas que aumentam o potencial de competição, com os demais microrganismos presentes no solo. Ferreira et al. (2014) também observaram que *Pseudomonas* sp. apresenta um maior número de mecanismos de ação, em relação a à outras bactérias testadas para a promoção de crescimento de arroz como *Burkholderia* sp e *Rhizobium* sp.

Diversos trabalhos demonstraram que o uso de combinações de diferentes gêneros bacterianos compatíveis é mais eficiente do que seu uso individualmente, pois estas geralmente apresentam maior estabilidade e atuam por diferentes mecanismos de ação (SOUZA-JUNIOR et al., 2010; FERREIRA et al., 2014). Porém

nesse estudo, as combinações não apresentaram resultados satisfatórios, sendo que a C03, que combina três espécies diferentes, apresentou o pior desempenho, mostrando pouca eficiência além de instabilidade na interação tratamento bacteriano x cultivar. Por outro lado, há que se considerar que um dos aspectos positivos do uso de combinações é o aumento da probabilidade da sobrevivência em diferentes ambientes, bem como sob flutuações de umidade e temperatura em condições de campo.

Por fim, o presente trabalho mostra o duplo comportamento benéfico de bactérias sabidamente biocontroladoras, ou seja efeito promotor de crescimento na ausência de patógenos; e reforça a necessidade de se conhecer o comportamento dos promotores de crescimento quando utilizados em diferentes genótipos vegetais, uma vez que o efeito destes é variável em função da existência de interações entre tratamento bacteriano e cultivar. Neste sentido, há que se buscar um tratamento que seja eficiente para o maior número de cultivares e que este comportamento se mantenha em condições de campo.

### **3.5 Conclusões**

As bactérias biocontroladoras DFs185 e DFs223 promovem crescimento de arroz na ausência de patógenos, sendo esta promoção cultivar dependente;

Bactérias biocontroladoras eficientes na promoção de crescimento de diferentes cultivares de arroz atuam por diferentes mecanismos.

## **4. CAPÍTULO III – Interação das bactérias biocontroladoras com agrotóxicos e microbiota do solo**

### **4.1 Introdução**

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura de destaque no cenário nacional, posicionando-se entre os cultivos de maior importância, tanto sob o ponto de vista de consumo, quanto de geração de renda aos agricultores. O Brasil está entre os dez maiores produtores de arroz do mundo. O estado do Rio Grande do Sul responde por mais da metade dessa produção, sendo a principal atividade econômica dos municípios da metade sul do estado (SOSBAI, 2014).

Para manter a produção de grãos em níveis elevados, além de utilizar cultivares de alto potencial produtivo, e do uso de adubação equilibrada, faz-se necessário também o uso de uma ampla gama de agrotóxicos. Atualmente são recomendados 104 agrotóxicos, entre fungicidas, herbicidas e inseticidas (AGROFIT, 2015). Uma das principais preocupações no uso intensivo desses produtos é a contaminação de mananciais hídricos e do solo. Dessa forma, buscam-se novas tecnologias que visam a sustentabilidade agrícola, sendo o controle biológico de doenças e pragas uma das principais alternativas.

O uso de microrganismos antagonistas para o controle de fitopatógenos causadores de doenças em arroz irrigado está sendo investigado com resultados satisfatórios. Bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* têm se mostrado eficientes no controle de algumas doenças do arroz (KRISHNAMURTHY; GNANAMANICKAM, 1998; YANG et al., 2007; SHIMOI et al., 2010).

O controle biológico muitas vezes é empregado isoladamente, todavia é desejável que esse seja associado a outras medidas de controle, inclusive ao controle químico. A inclusão do biocontrole em um programa de manejo fitossanitário, além de, proporcionar o controle de doenças e a promoção do crescimento de plantas, também

pode interferir na qualidade microbiológica do solo. Estudos têm identificado a compatibilidade do uso de fungicidas com alguns gêneros de bactérias biocontroladoras e/ou promotoras de crescimento de plantas (BRANNE; KENNY, 1997; GOPALAKRISHNAN et al., 2012). Entretanto, Keinath et al. (2000) diagnosticaram a ocorrência de incompatibilidade entre esse gênero de bactérias e alguns produtos químicos. Dessa forma, é necessário o conhecimento dos produtos químicos que possam ser utilizados juntamente com esses microrganismos constituindo uma estratégia de manejo integrado de doenças e pragas (BUCHENAUER, 1998).

Por outro lado, a introdução de microrganismos no solo pode ocasionar mudanças na comunidade nativa do solo (PRASHAR; KAPOOR; SACHDEVA, 2014), com reflexos na qualidade do solo rizosférico.

A biomassa microbiana do solo (BMS) é considerado a parte viva e ativa da matéria orgânica do solo, constituída pelas bactérias, fungos, actinomicetos, protozoários, algas e microfauna (TÓTOLA; CHAER, 2002). Representa de 2 a 5% do carbono orgânico e de 1 a 5% do nitrogênio total do solo (SMITH; PAUL, 1990), sendo responsável pela decomposição e acúmulo da matéria orgânica do ambiente, controlando dessa forma a dinâmica dos nutrientes minerais disponíveis (ROSCOE et al., 2006). Portanto, a qualidade do solo pode ser mensurada pelas alterações da BMS, bem como pela respiração basal determinada pela quantidade de CO<sub>2</sub> liberada durante o processo respiratório dos microrganismos presentes no solo (ZIBILSKE, 1994).

Trabalhos desenvolvidos utilizando isolados de espécies de *Pseudomonas* e de *Bacillus* (DFs185, DFs223, DFs306 e DFs416) mostraram o potencial destas como biocontroladores e promotores de crescimento de plantas de arroz (LUDWIG; MOURA, 2007; LUDWIG et al., 2009; SOUZA-JÚNIOR et al., 2010; SOARES et al., 2012). No entanto, não há conhecimento da forma como estas interagem com a microbiota do solo, nem do seu comportamento na presença de agrotóxicos.

Assim sendo, este estudo teve como objetivo determinar o comportamento destas bactérias na presença de agrotóxicos, bem como verificar possíveis alterações da qualidade microbiológica de um solo durante o cultivo de plantas de arroz, no qual as sementes de arroz foram microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos.

## **4.2 Material e Métodos**

O trabalho de campo foi desenvolvido na área experimental do Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA) localizada em Areia Grande, no município de Torres-RS. As análises foram feitas nos Laboratórios de Bacteriologia Vegetal e de Microbiologia do Solo pertencentes à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas.

### **4.2.1 Isolados bacterianos utilizados**

Os isolados bacterianos utilizados são pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas. Estes isolados foram isolados por Moura e colaboradores em 1997 (MOURA et al., 1998) e selecionadas por Ludwig et al., (2009) e suas combinações por Souza-Júnior (2010). Os isolados bacterianos utilizados foram: DFs185 (*Pseudomonas synxantha*), DFs223 (*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificada) e DFs416 (*Bacillus* sp.), sendo estes utilizados individualmente (DFs185, DFs223 e DFs306) ou em combinação: C01 (DFs185 + DFs306), C02 (DFs306 + DFs416) e C03 (DFs185 + DFs306+ DFs416), e como controle utilizou-se solução salina (NaCl 0.85).

### **4.2.2 Compatibilidade com agrotóxicos**

Para a realização desse trabalho foram utilizadas as bactérias individualmente, a fim de confrontar os isolados com diferentes princípios ativos registrados para cultura do arroz como, fungicidas, herbicidas e inseticidas (tab. 13).

Tabela 13 – Ingrediente ativo, concentração do produto comercial e dose dos agrotóxicos (fungicidas, herbicidas e inseticidas) utilizados nos ensaios de compatibilidade

Ingrediente ativo	Concentração do produto comercial	<sup>1</sup> Dose (L ou kg do p.c. ha <sup>-1</sup> )
Fungicidas		
Azoxistrobina	250 g L <sup>-1</sup>	0,40 L
Piraclostrobina + epoxiconazol	133 + 50 g L <sup>-1</sup>	1,00 L
Trifloxistrobina + tebuconalozol	100 + 200 g L <sup>-1</sup>	0,75 L
Herbicidas		
Cyhalofop-p-buthyl	180 g L <sup>-1</sup>	1,75 L
Clomazone	500 g L <sup>-1</sup>	1,40 L
Imazapic + imazethapyr	75 + 25 g L <sup>-1</sup>	1,50 L
Penoxsulam	240 g L <sup>-1</sup>	0,25 L
Profoxidim	200 g L <sup>-1</sup>	0,85 L
Propanil	360 g L <sup>-1</sup>	10,00 L
Inseticidas		
Cipermetrina	200 g L <sup>-1</sup>	0,075 L
Clorantraniliprole	350 g kg <sup>-1</sup>	0,085 kg
Lambda cialotrina	50 g L <sup>-1</sup>	0,150 L
Tiametoxam	350 g L <sup>-1</sup>	<sup>2</sup> 0,4 L

<sup>1</sup>Dose do produto comercial (p.c.) por hectare; <sup>2</sup>Dose do produto comercial para 100 kg de sementes.

Em um primeiro ensaio foi avaliada a tolerância das bactérias aos diferentes grupos de agrotóxicos, e num segundo ensaio, a resistência destas a diferentes fungicidas. Para realização dos ensaios foram preparadas soluções estoques de cada princípio ativo na concentração de 200%, respeitando a dosagem recomendada na bula do produto para um hectare. Em tubos de reação de 1 mL foram realizadas as diluições da solução estoque para formação dos tratamentos do primeiro ensaio (0, 50%, 100%, 150% e 200%), bem como do segundo (10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0). Para ambos os ensaios utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Para a avaliação da tolerância, placas de Petri descartáveis esterilizadas receberam 10 mL de meio 523 sólido (KADO; HESKETT, 1970). Após solidificação,

foram adicionados 100 µL de cultivo bacteriano com 24 horas de crescimento em meio 523 líquido, que foram espalhados por toda a placa. Logo, foram distribuídos cinco discos de papel filtro esterilizados e sobre cada disco foram pipetados 10 µL de cada uma das concentrações do produto. As placas foram fechadas, identificadas e incubadas a 28°C.

As avaliações foram realizadas após 24 horas de incubação, sendo constituída da observação de formação ou não de halos de inibição ao redor dos discos de papel filtro. As avaliações foram realizadas de forma qualitativa atribuindo-se sinais positivos (+) para a formação de halo, e negativos (-) para ausência de halos, representando a compatibilidade ou incompatibilidade, respectivamente.

O segundo ensaio, realizado com o objetivo de avaliar a resistência, observou-se a capacidade das bactérias biocontroladoras em utilizar o carbono e nitrogênio presente nos fungicidas. Para isso utilizou-se meio mínimo (MM) constituído de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g), MgPO<sub>4</sub> (0,75 g) e NaCl (8 g). As bactérias foram repicadas, 24 horas antes, em meio 523 líquido modificado, utilizando-se metade da sacarose recomendada. Os tratamentos foram constituídos a partir de concentrações dos fungicidas utilizados na cultura do arroz irrigado: 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0%.

As soluções dos fungicidas foram filtradas e colocadas em placas de Petri descartáveis estéreis e que receberam posteriormente 10 mL do MM, que foi misturado aos fungicida por movimentos circulares. Após solidificação do meio foram adicionados 100 µL da bactéria crescida em meio líquido. Como controle positivo utilizou-se placa contendo meio 523 sem adição de agrotóxico. As placas foram vedadas com parafilm® e incubadas a 28°C. A partir de 24 horas observou-se a formação das colônias bacterianas, e então se iniciou a contagem de colônias até 72 horas após o aparecimento das primeiras colônias.

#### **4.2.3 Impacto dos tratamentos bacterianos sobre a microbiota do solo**

Esse experimento teve como objetivo observar possíveis alterações microbiológicas no solo, decorrentes da microbiolização das sementes com bactérias biocontroladoras.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso contendo três repetições. Os tratamentos utilizados foram descritos na tab. 16. As unidades experimentais foram compostas por parcelas de 1,20 m de comprimento

por 0,60 m de largura, contendo quatro linhas espaçadas por 0,15 m. A densidade de semente utilizada foi de 110 kg ha<sup>-1</sup> de sementes de arroz.

A microbiolização das sementes (cultivar IRGA 420) foi realizada a campo no momento da sementeira, sendo que isolados bacterianos foram repicados em meio sólido 24 horas antes. As suspensões foram preparadas em um Becker (600 mL) e, a concentração foi ajustada para 10<sup>4</sup> ufc/mL seguindo a escala de Mc Farland. Em seguida, 100 mL da suspensão, foram colocadas em sacos plásticos contendo as sementes, e agitadas durante 10 minutos. Para os tratamentos com combinação tripla foram utilizados 35 mL de cada suspensão e para dupla 50 mL. O tratamento BION® (acibenzolar-S-metílico) foi formulado de acordo com o recomendado pelo fabricante (10g de produto comercial por 100 kg de sementes). Após a agitação, retirou-se o excesso da suspensão, deixando-se as sementes secar a sombra, até o momento da sementeira.

As coletas das amostras de solos foram realizadas quando as plantas de arroz estavam em estágio V6, sendo retiradas três sub-amostras, próximo às raízes das plantas, entre as linhas centrais (trado holandês; 0-20 cm de solo), para formar uma amostra composta de 1 kg. As amostras foram armazenadas em uma caixa de isopor com gelo. Uma vez no laboratório, retirou-se uma sub-amostra de cada amostra de solo para cálculo da umidade, para fazer as correções de peso necessários aos cálculos, e após as amostras foram transferidas para um freezer.

#### 4.2.3.1 Respiração Basal do solo

A respiração basal do solo foi determinada pela quantificação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) liberado no processo de respiração microbiana, durante um período de 30 dias, conforme metodologia proposta por Stotzky (1965). Amostras de 100 g de solo seco de cada unidade experimental, foram acondicionadas em frascos de vidro com capacidade de 0,8 L hermeticamente fechados. Cada frasco recebeu um copo de polietileno de 50 mL contendo 20 mL de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, com a finalidade de captar o CO<sub>2</sub> liberado pela microbiota do solo. Esse foi determinado aos 30 dias, adicionando-se 5mL de uma solução de BaCl<sub>2</sub> (25%) e três gotas de fenolftaleína (1%) em cada copo, titulando-se o excesso de NaOH com uma solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> padronizada. Como prova branca, foram feitos dois frascos contendo apenas solução de NaOH.

O cálculo de C-CO<sub>2</sub> desprendido do solo foi calculado segundo a equação 3.

$$mg\ C - CO_2\ 100\ g^{-1}\ solo = (VPB - VA) \times M\ \acute{a}cido \times Eq.\ C - CO_2 \times FC \text{ [eq. 3], onde:}$$

VPB = volume de HCl gasto na prova em branco (mL);

VA= volume de HCl gasto na titulação do NaOH que recebeu o CO<sub>2</sub> desprendido do solo (mL);

M ácido= concentração de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>;

Eq. C-CO<sub>2</sub> = Equivalente grama do C-CO<sub>2</sub> = 6g

FC= fator de correção (concentração do ácido/concentração da base)= 1,0.

#### 4.2.3.1 Matéria orgânica e Carbono orgânico

Para determinação da matéria orgânica e do carbono orgânico presentes nas amostras, foi utilizado o teste Walkley Black (TEDESCO et al., 1995), em que 0,5 g de solo foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL e adicionados 10 mL da solução de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (1N). Posteriormente, sob leve agitação do frasco foram adicionados 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N). As amostras foram deixadas em repouso durante 10 minutos e depois de esfriadas foram adicionados 100 mL de água destilada e três gotas de solução do complexo de ferroin (0,025N), que serve como um indicador, e titulado com FeSO<sub>4</sub> (0,5N). Foi feita uma prova branca, com um frasco vazio, sem a presença do solo.

O cálculo de teor de carbono orgânico do solo foi calculado de acordo com a equação 4.

$$\%C = \frac{me\ K_2Cr_2O_7 - me\ FeSO_4}{MSS} \times 0,4 \text{ [eq. 4], onde:}$$

meK<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>= miliequivalente de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> adicionado a amostra;

me FeSO<sub>4</sub>= miliequivalente de FeSO<sub>4</sub> adicionado à amostra;

MSS= massa do solo seco da amostra

#### 4.2.3.3 Carbono da biomassa microbiana

A biomassa microbiana do solo foi determinada pelo método descrito por Vence et al. (1987), conhecido como Método da Irradiação – Extração. Para esse método foi utilizado um forno de micro-ondas (2.450 MHz, Panasonic®, modelo EM 9003B). Foram retiradas 40 g de solo (umidade foi corrigida) em duplicata. Um grupo dessas amostras, sem tratamento de irradiação foram colocadas em frascos “snap-cap” de 100 mL contendo 50 mL de solução K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 mol L<sup>-1</sup>). O outro grupo, que foi destinado à irradiação da microbiota, foi colocado em placas de Petri esterilizadas e irradiadas por 4 minutos. Posteriormente, estas amostras foram transferidas para frascos “snap-cap” contendo a mesma solução de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 mol L<sup>-1</sup>). Todas as amostras foram agitadas durante 30 minutos em agitador horizontal com 60 oscilações por minuto. Após a decantação, foi retirado uma alíquota de 25 mL do sobrenadante (carbono microbiano) e colocado em um Erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Foram adicionados 5mL de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (1,25 mol/L<sup>-1</sup>) e 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Quando a solução esfriou foram adicionados 50 mL de água destilada e agitado. Posteriormente foram adicionadas três gotas do indicador ferroin para então ser titulado com FeSO<sub>4</sub>(0,25 mol L<sup>-1</sup>).

O cálculo de C irradiado e não irradiado (mg kg<sup>-1</sup>) foi segundo a equação 5.

$$C \text{ (mg Kg}^{-1}\text{)} = \frac{(m \text{ mol L}^{-1} \text{Cr}_2\text{O}_7^{-1} - m \text{ mol L}^{-1} \text{Fe}^{2+})}{g \text{ da amostra}} \times 300 \text{ [eq. 5], onde:}$$

$$m \text{ mol L}^{-1} \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{-1} = 5 \text{ mL} \times 1,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ 6,25;}$$

$$m \text{ mol L}^{-1} \text{Fe}^{2+} = (\text{mL de FeSO}_4 \text{ gastos na titulação de cada amostra}) \times (\text{mol L}^{-1} \text{FeSO}_4);$$

$$\text{mol L}^{-1} \text{FeSO}_4 = 6,25 \text{ mL de FeSO}_4 \text{ gastos na prova branca.}$$

E por fim foi feito o cálculo do carbono da biomassa, calculado de acordo com a equação 6:

$$C \text{ biomassa} = \frac{C \text{ amostra irradiada} - C \text{ amostra não irradiada}}{Kc} \text{ [eq. 6], onde:}$$

$$Kc = \text{constante de mineralização do carbono (0,33).}$$

#### 4.2.3.4 Quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>)

O quociente metabólico foi calculado pela razão entre a respiração basal e o carbono da biomassa microbiana (PIRT, 1975; ANDERSON; DOMSCH, 1978), segundo a equação 7.

$$qCO_2 = \frac{\mu g CO_2 h^{-1} g^{-1} de\ solo}{\mu g C g^{-1} de\ solo} [eq. 7].$$

#### 3.2.3.5 Quociente microbiano (qMic)

O quociente microbiano foi calculado pela razão entre o carbono microbiano e carbono total, segundo a equação 8.

$$qMic = \frac{Carbono\ microbiano}{Carbono\ total\ mg\ kg^{-1}} \times 100 [eq. 8]$$

#### 3.2.3.6 Análise estatística

As variáveis respostas foram submetidas à análise da variância pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ) e quando significativos, foi realizado a comparação de médias dos tratamentos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste Scott-Knott, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Compatibilidade com agrotóxicos

Na avaliação da compatibilidade entre os ingredientes ativos (i.a.) de fungicidas na cultura do arroz irrigado e os isolados biocontroladores, observou-se que todos os isolados foram tolerantes a todos os produtos, independente da dose utilizada (tab.14). O mesmo efeito pode ser observado, quando os mesmos isolados foram confrontados com os i.a. dos herbicidas, em que todos os isolados cresceram normalmente, não apresentando limitações no desenvolvimento das mesmas (tab. 15).

Tabela 14 – Avaliação da compatibilidade de quatro isolados bacterianos frente a diferentes ingredientes ativos de fungicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado

Princípio ativo	Doses (%)	Isolados bacterianos			
		DFs185	DFs223	DFs306	DFs416
Azoxistrobina	0	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	150	+	+	+	+
	200	+	+	+	+
Piraclostrobina + Epoxiconazol	0	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	150	+	+	+	+
	200	+	+	+	+
Trifloxistrobrina + Tebuconazol	0	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	150	+	+	+	+
	200	+	+	+	+

(+): compatibilidade com os ingredientes ativos testados; (-): incompatibilidade com os ingredientes ativos testados.

Tabela 15 – Avaliação da compatibilidade de quatro isolados bacterianos frente à diferentes ingredientes ativos de herbicidas recomendados para cultura do arroz irrigado

Ingrediente ativo	Doses (%)	Isolados bacterianos			
		DFs185	DFs223	DFs306	DFs416
Clefoxydim	0	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	150	+	+	+	+
	200	+	+	+	+
Clomazone	0	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	150	+	+	+	+
	200	+	+	+	+
Cyhalofop-p-buthyl	0	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	150	+	+	+	+
	200	+	+	+	+
Imazapyr + Imazethapyr	0	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	150	+	+	+	+
	200	+	+	+	+
Propanil	0	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	150	+	+	+	+
	200	+	+	+	+

(+): compatibilidade com os ingredientes ativos testados.

No entanto, quando as bactérias foram repicadas em meio contendo i.a. de inseticidas, com exceção do isolado DFs416, observou-se a sensibilidade destas, pois não apresentaram crescimento (tabela 16).

Tabela 16 – Avaliação da compatibilidade de quatro isolados bacterianos frente a diferentes ingredientes ativos de inseticidas recomendados para cultura do arroz irrigado

Princípio ativo	Doses (%)	Isolados bacterianos			
		DFs185	DFs223	DFs306	DFs416
Cipermetrina	0	+	+	-	+
	50	-	-	-	+
	100	-	-	-	+
	150	-	-	-	+
	200	-	-	-	+
Tiametoxan	0	+	+	-	+
	50	-	-	-	+
	100	-	-	-	+
	150	-	-	-	+
	200	-	-	-	+
λ-cialotrina	0	+	+	-	+
	50	-	-	-	+
	100	-	-	-	+
	150	-	-	-	+
	200	-	-	-	+

(+): compatibilidade com os ingredientes ativos testados; (-): incompatibilidade com os ingredientes ativos testados.

No segundo ensaio buscou-se identificar quais isolados bacterianos se desenvolviam em meio contendo apenas carbono e nitrogênio dos agrotóxicos. Observou-se um comportamento diferenciado para as quatro bactérias avaliadas. Os isolados DFs306 e DFs416 não se desenvolveram em nenhuma concentração dos três compostos adicionados ao meio, nem tão pouco na ausência destes, embora tenha crescido com abundância no meio 523, utilizado como controle positivo. Exceção feita para DFs416 em azoxistrobina que teve um crescimento quase nulo.

O isolado DFs185 apresentou comportamento distinto para cada um dos fungicidas adicionados ao meio como fonte de nutrientes. Na presença de azoxistrobina se desenvolveu normalmente, não havendo diferenças entre o controle e as diferentes dosagens do composto, e portanto pode também ser considerado tolerante. (tab. 16). Na presença de piraclostrobina + epoxiconazol, o isolado DFs185 utilizou as fontes de C e N fornecidos pelo i.a, apresentando aumento no número de colônias (44) na dose de 0,5%, em relação a testemunha (4,6). Porém na presença de trifloxitrobina + tebuconazol, ocorreu tolerância sendo que nas maiores doses houve uma redução no número de unidades formadoras de colônias (ufc), mostrando que esta tolerância pode ser dose dependente (tab. 17).

Tabela 17 – Número de unidades formadoras de colônias, por placa, de isolados bacterianos, utilizando apenas como fonte de carbono e nitrogênio presentes nos ingredientes ativos de três fungicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado

Doses fungicidas	Isolados bacterianos			
	DFs185	DFs223	DFs306	DFs416
	Azoxistrobina			
0%	+100	60	0	21
0,1%	+100	53	0	8
0,5%	+100	56	0	2
1%	+100	+100	0	2
5%	+100	+100	0	5
10%	+100	60	0	4
	Piraclostrobina + Epoxiconazol			
0%	4,6	55	0	0
0,1%	0	22	0	0
0,5%	44	40	0	0
1%	6,5	22	0	0
5%	12,24	54	0	0
10%	2	63	0	0
	Trifloxistrobina + Tebuconazol			
0%	+100	30	0	0
0,1%	+100	58	0	0
0,5%	+100	39	0	0
1%	59	68	0	0
5%	36	25	0	0
10%	63	56	0	0
Meio 523	+100	+100	+100	+100

Por outro lado, o isolado DFs223, apresentou tolerância a todos os i.a em todas as concentrações usadas. Adicionalmente, utilizou Azostrobina nas concentrações de 1 a 5%, mostrando aumento consistente de ufc. (tab. 16).

#### 4.3.2 Impacto dos tratamentos bacterianos na microbiota do solo

De modo geral o tratamento de sementes com bactérias ou com Bion® resultou em diferenças significativas para todas as variáveis analisadas, exceto para carbono orgânico no solo (tab. 17). Observaram-se aumentos para as demais variáveis, além de reduções para o carbono da biomassa microbiana (carbono microbiano) e o quociente microbiano.

Analisando-se o carbono da biomassa microbiana, observa-se que o tratamento C01 foi o único que apresentou maior incorporação de carbono (C) pelos microrganismos com teor de 462,54 mg kg<sup>-1</sup>, valor 17% superior ao encontrado para a testemunha e 97% maior que o observado para o isolado DFs223. O quociente microbiano seguiu a mesma tendência sendo a C01 que apresentou o maior valor 1,20 (19% maior que a testemunha e 120% superior ao menor valor, apresentado pelo isolado DFs185) (tab. 18).

Tabela 18 – Teores de carbono orgânico total, carbono microbiano e quociente microbiano, em solo cultivado com sementes arroz irrigado tratadas com isolados bacterianos e Bion®

Tratamentos	Biomassa	Carbono	Respiração	Quociente	Quociente
	Microbiana	Orgânico	Basal	Microbiano	Metabólico
	mg kg <sup>-1</sup>		µg C-CO <sub>2</sub> / h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	qCO <sub>2</sub> x10 <sup>-3</sup>
DFs185	266,63 d	3,792 <sup>ns</sup>	0,41 a*	0,54 d	2,06 a*
DFs223	235,86 d	3,922 <sup>ns</sup>	0,26 b	0,60 d	0,84 c
DFs306	281,79 d	3,915 <sup>ns</sup>	0,32 b	0,72 c	1,30 b
C01	462,54 a*	3,955 <sup>ns</sup>	0,35 b	1,20 a*	0,75 c
C02	324,77 c	3,916 <sup>ns</sup>	0,46 a	0,97 b	1,46 b
C03	341,28 c	3,955 <sup>ns</sup>	0,36 b	0,86 b	0,82 c
Bion®	308,25 c	3,942 <sup>ns</sup>	0,34 b	0,81 c	1,10 c
Testemunha	395,03 b	3,683 <sup>ns</sup>	0,30 b	1,01 b	0,76 c
CV(%)	9,46	3,64	11,49	8,11	15,56

<sup>ns</sup>: Médias não diferem entre si pelo teste F.

\*: Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Scott-Knott, sendo significativo a 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação.

A respiração basal (C-CO<sub>2</sub>) foi aumentada pelo isolado DFs185 e pela combinação C02 (36 e 53% respectivamente). Para o quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) observaram-se dois níveis de aumento: intermediário para o isolado DFs306 (71%) e combinação C02 (92%); e superior, para o isolado DF185 (171%). Em outro sentido, a combinação C01 que resultou nos maiores valores para as demais variáveis, apresentou respiração basal e de quociente metabólico de 0,35 e 0,75, respectivamente (tab. 17).

O BION<sup>®</sup> utilizado resultou em redução da biomassa microbiana e do quociente microbiano, sem alterar o valor das demais variáveis.

## 4.4 Discussão

### 4.4.1 Compatibilidade com agrotóxicos

A busca por medidas de controle que possam ser utilizadas concomitantemente são à base da evolução do manejo integrado. Assim sendo, métodos de seleção utilizados para encontrar potenciais biocontroladores como a avaliação da compatibilidade desses frente a diferentes agrotóxicos, surge como uma ferramenta adicional, explorando a possibilidade daqueles microrganismos que resistem ou toleram os efeitos do controle químico, e desta forma, potencializar a ação de ambas as medidas de controle.

Neste sentido, as bactérias biocontroladoras aqui estudadas se adequariam ao uso em conjunto com a maioria dos agrotóxicos registrados para o cultivo do arroz uma vez que os isolados bacterianos se mostraram tolerantes à presença dos i.a. de fungicidas e herbicidas. Estudos que avaliam efeitos de agrotóxicos sobre microrganismos benéficos utilizados na agricultura mostram resultados semelhantes. Myresiotis, Vryzas e Mourkidou (2012), observaram que a presença de tiometoxam no solo, não interferiu no desenvolvimento de espécies de *Bacillus*. Esses autores ainda observaram que as espécies de *Bacillus* apresentam desenvolvimento normal na presença dos herbicidas metribuzin e napropamide; e dos fungicidas acibenzolar-S-metil e cloridrato de propamocarbe. No entanto em doses elevadas, como o dobro da recomendada pelo fabricante dos i.a metribuzin e tiametoxam inibiram o desenvolvimento de *Rhizobium* sp, quando cultivado em meio líquido na presença

desses i.a. (AHEMAD; KHAN, 2011). Esses mesmo autores em 2012 estudaram o efeito de três herbicidas sobre *Pseudomonas putida* e observaram que quando utilizados em dose máxima havia redução no desenvolvimento da bactéria, mesmo ela apresentando tolerância a sua presença. Os autores constataram ainda, que na presença de quizalafop-p-etil em altas concentrações ocorria uma redução na produção ácido indol acético, sideróforos e exopolissacarídeos, propriedades importantes para microrganismos promotores de crescimento de plantas.

A capacidade que os microrganismos têm em protegerem-se da presença de compostos químicos pode ocorrer por dois mecanismos: tolerância e resistência. A resistência ocorre quando o isolado bacteriano é capaz de degradar o agrotóxico (ORTIZ-HERNÁNDEZ; SA'NCHEZ-SALINAS 2010). No segundo ensaio pode-se constatar esse efeito para os isolados de *Pseudomonas* DFs185 (piraclostrobina + epoxiconazol) e DFs223 (azostrobina). Este isolado conseguiu se desenvolver na presença apenas de carbono e nitrogênio fornecido pelos i.a. dos fungicidas. Vários trabalhos mostram que as *Pseudomonas* possuem alta capacidade de degradar fungicidas, como tebuconazole, e herbicidas como a atrazina (MANDELBAUM; ALLAN; WACKETT, 1995; JAYASHREE; VASUDEVAN, 2007). A espécie *Pseudomonas fluorescens* quando cultivada em meio líquido tendo como única fonte de carbono e nitrogênio de tebuconazole (20 mg L<sup>-1</sup>) demonstrou capacidade de degradar de 10 e 70% o fungicida em 6 e 21 dias, respectivamente (OBANDA; SHUPE, 2009).

Esses resultados apontam para a possibilidade destas bactérias serem utilizadas em conjunto com estes agrotóxicos. Adicionalmente os isolados de *Pseudomonas* apresentam dois aspectos positivos: poder competir com a microbiota nativa em vantagem por utilizar fonte de carbono e nitrogênio não usual, e assim, também reduzir o impacto ambiental do uso destes fungicidas pois ao utilizá-los como nutriente, estas bactérias os degradam.

#### **4.4.2 Impacto dos tratamentos bacterianos na microbiota do solo**

Por meios das análises realizadas com o solo retirado do campo, que receberam sementes microbiolizadas, observou-se que não ocorreram grandes interferências das bactérias introduzidas em relação à qualidade do solo, embora diferenças estatísticas tenham sido anotadas para a maioria das variáveis. A quantidade de carbono orgânico manteve-se constante entre todos os tratamentos.

Os valores encontrados são considerados altos, acima de 2,9 de acordo com Rollas (2004).

A combinação C01 foi o único tratamento a aumentar a biomassa microbiana presente no solo (462, 54 mg kg<sup>-1</sup>). Não existe um padrão de qual o valor ideal para esta variável, por isso utiliza-se o quociente microbiano, que representa o percentual que o carbono microbiano ocupa dentro do carbono orgânico total do solo (TÓTOLA; CHAER, 2002). Neste caso, o valor para C01 seguiu a tendência da biomassa microbiana, sendo o maior (1,20), representando assim, um valor intermediário em relação aos solos brasileiros, onde esse índice varia entre 0,1 e 2,6 em solos cultivados (SANTOS et al., 2004; VARGAS et al., 2004). Esses dados reforçam que o tratamento C01 foi o mais estável, pois em uma condição de stress para a microbiota do solo (no caso, a introdução de microrganismos) a capacidade de utilização de carbono é menor e, conseqüentemente o quociente metabólico é reduzido (WARDLE, 1994).

Essa estabilidade do tratamento C01 pode ser confirmada pela baixa respiração basal 0,35  $\mu\text{C-CO}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$ , de acordo com USDA (2001), que estabelece que a respiração basal seja baixa, entre valores de 0,23 e 0,37  $\mu\text{C-CO}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$ . Esse ponto é positivo, pois indica que não está havendo um stress na microbiota, sendo acompanhada pelo quociente metabólico que nos remete a pensar que ambiente microbiano encontra-se estável, uma vez que o  $q\text{CO}_2$  é baixo (0,75).

De acordo com Roscoe et al. (2006), um ambiente eficiente, de qualidade é aquele em que a perde menos carbono na forma de  $\text{CO}_2$  com a respiração e que incorpora mais carbono nos tecidos microbianos. Esses dois fatores podem ser observados no tratamento C01, em que o ambiente manteve-se mais estável na presença dos isolados introduzidos no ambiente solo.

#### **4.5 Conclusões**

Bactérias biocontroladoras apresentam tolerância e resistência a diferentes ingredientes ativos de agrotóxicos registrados para o cultivo do arroz irrigado.

Bactérias biocontroladoras introduzidas no solo por meio da microbiolização de sementes alteram algumas variáveis microbianas associadas à qualidade do solo.

Bactérias biocontroladoras podem ser incluídas no manejo integrado de doenças em arroz sem prejuízos aos microrganismos nativos do solo.

## 5. Considerações Finais

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo tem potencial para o controle de *Bipolaris oryzae* em arroz irrigado, atuando também como promotores de crescimento em estágios iniciais da cultura.

Quando se busca um produto biológico espera-se que ele tenha um comportamento estável, em relação às cultivares a serem utilizadas, a fim de promover um menor custo ao produtor. Nesse sentido, podemos destacar dois isolados bacterianos, DFs185 e DFs223, que atuaram de forma estável, tanto para biocontrole como para promoção de crescimento de diferentes cultivares.

Outro aspecto desejável do produto biológico é a sua inserção no manejo integrado de pragas. Neste sentido os referidos isolados também se destacaram, pois, foram tolerantes e/ou resistentes a diferentes ingredientes ativos de fungicidas e de herbicidas.

Por outro lado, estas bactérias mostraram uma capacidade de produzir um arsenal diversificado de compostos relacionados ao biocontrole e promoção de crescimento. Este aspecto maximiza as possibilidades de serem efetivos para diferentes patógenos, sob diversas condições de ambiente.

A crescente preocupação com o meio ambiente e o impacto sofrido por diferentes intervenções agrícolas faz com que se pense, também, nas repercussões do uso de biocontroladores. Neste sentido, as bactérias estudadas de modo geral não reduziram a qualidade microbiológica do solo. Adicionalmente o uso da combinação destas (C01) resultou em impacto favorável, melhorando alguns aspectos da qualidade microbiológica do solo.

Por fim, embora os resultados obtidos sejam favoráveis, há a necessidade de trabalhos futuros a fim de conhecer melhor os mecanismos de ação que são utilizados para o biocontrole e promoção de crescimento, e desenvolver em formulação de produtos que venham a contribuir de forma positiva no campo.

## 6. Referências

- AGROFIT (Base de dados de produtos agrotóxicos e fitossanitários). Secretaria de Defesa Agropecuária/ Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasília, 2015. Disponível em: [/agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acessado em: 14 de mar de 2015.
- AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Evaluation of plant-growth-promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. **Annual Microbiology**, v. 62, p. 1531-1540, 2012.
- AHEMAD, M; KHAN, M.S. Ecotoxicological assessment of pesticides towards the plant growth promoting activities of Lentil (*Lens esculentus*)-specific *Rhizobium* sp. Strain MRL3. **Ecotoxicology**, v. 20, p .661–669, 2011.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiololy Research**, v.163, p.173–181, 2006.
- AKTAR, M.S.; SIDDIQUI, Z.A. Use of plant growth promoting rhizobacteria for the biocontrole of root-rot disease complex of chickpea. **Australian Plant Pathology**, v.38, p.44-50, 2009.
- AMBROSINI, A.; BENEDUZI, A.; STEFANSKI, T.; PINHEIRO, F.G.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Soil**, v.356, p.245–264, 2012.
- ANANDHAM, R.; CHOI, K. H.; GANDHI, P. I.; YIM, W. J.; PARK, S. J.; KIM, K. A.; MADHAIYAN, M. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v.23, n.8, p.1121-1129, 2007.
- ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. **Soil Biological and Biochemical**, v.10, p.215-221,1978.
- BAL, H.M.; NAYAK, L.; DAS, S.; ADHYA, T.K. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. **Plant Soil**, v.366, p.93–105, 2013.

BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria: UFSM, 2001. 48p.

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.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L.K.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.311–320, 2008.

BISWAS, J. C., LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v.92, p.880-886, 2000.

BOER, M. de; SLUIS, I. van der; LOON, L.C. van; BAKKER, P.A.H.M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.201-210, 1999.

BRANNEN.P.M.; KENNEY, D.S. Kodiak®—a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.169–171, 1997.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 105, p. 329-348,1998.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.105, p.329-348,1998.

ÇAKMAKÇI, R.; ERAT, M.; ERDOGAN, U.; DONMEZ, M.F. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plant. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v.170, p.288–295, 2007.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. (Documentos 139).

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.

CHENG, Z.; PARK, E.; GLICK, B.R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. **Journal Microbiology**, v.53, p.912-918, 2007.

CHOUDHURY, A. T. M. A.; KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production, **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.39,n.7, p.219-227, 2004.

CHUANKUN, X.; MINGHE, M.; LEMING, Z.; KEQIN, Z. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1997–2004, 2004.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO-RS/ SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS/ CQFS, 2004. 400p.

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.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto 2014**. Brasília: Conab, 2014. 82p.

CORRÊA, B.O.; SCHAFER, J.T.; MOURA, A.B. Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean. **Biological Control**, v. 72, p.71–75, 2014.

COUNCE, P.A.; KEISLING, T.C.; MITCHELL, A.J. A uniform objective, and adaptive 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, p.626 – 632, 2003.

DE LA FUENTE, L.; LANDA, B.B.; WELLER, D.M. Host crop affects rhizosphere colonization and competitiveness of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, n.96, p.751–762, 2006.

DE SOUZA, J. T.; WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M. Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. **Phytopathology**, n.93, p.54–63, 2003.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.2, p.107-149, 2003.

DORIGHELLO, D.V.; BETTIOL, W.; MAIA, N.B.; LEITE, R.M.V.B.C. controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**, n.7, p.59-65, 2015.

ETESAMI, H.; HOSSEINI, H.M.; ALIKHANI, H.A.; MOHAMMADI, L. Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase and indole-3-acetic acid (IAA) as endophytic preferential selection traits by rice Plant seedlings. **Journal Plant Growth Regulation**, v.33, p.654-670, 2014.

EPAGRI. **Sistemas de produção de arroz irrigado em Santa Catarina** (pré-germinado). 2.ed. Florianópolis, 2005. 87p.

FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J. **Plant Bacterial Diseases**. Academic Press Australia, 1983, 393p.

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S.B.; LISBOA, B.B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v.55, p.44–52, 2012

FERNANDO, W.G.D.; RAMARATHNAMA, R.; KRISHNAMOORTHY, A.S.; SAVCHUK, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology Biochemical**, n.37, p.955–964, 2005.

FERREIRA, E.P.B.de; KNUPP, A.M.; MARTIN-DIDONET, C.C.G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryzae sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal** Uberlândia, n. 3, p. 655-66, 2014.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Consultado em 21 de março de 2015, em: [http://www.fao.org/waicent/portal/statistics\\_en.asp](http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp)

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.76, p.1145–1152, 2007.

FRANCESCO, A.D.; UGOLINI, L.; LAZZERI, L.; MARTA, M. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, v.81, p.8–14, 2015.

GLICK, B. R.; PENROSE, D.M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal Theoretical Biological**, v.19, p. 63-68, 1998.

GLICK, B.R.; PASTERNAK, J.J. Plant growth promoting bacteria. In: GLICK, B.R.; PASTERNAK, J.J (eds) **Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA**, 3rd. Washington: ASM Press, 2003 p.436–454, 2003.

GLICK, B.R.; PATTEN, C.L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D.M. **Biochemical and genetics mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. London: Imperial College Press, 1999.

GLICK, B.R.C.B.; JACOBSON, M.M.K.; SCHWARSE, J.; PASTERNAK, J.J. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida*GR 12-2 do not stimulate canola root elongation. **Canadian Journal Microbiology**, v.40, p.911-915, 1994.

GOLDFARB, K.C.; KARAOZ, U.; HANSON, C.A.; SANTEE, C.A.; BRADFORD, M.A.; TRESEDER, K.K.; WALLENSTEIN, M.D.; BRODIE, E.L. Differential growth responses

of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. **Frontiers Microbiology**, v.2, p.94, 2011.

GOMES, A.S., JÚNIOR, A.M.M. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Editores Técnicos, Brasília, DF: EMBRAPA - Informação Tecnológica. 2004. 899p.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v.37, p.25-30, 2003.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, n.3, p.307–319, 2005.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHME, D. I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v.60, p.579-598, 2010

HERNÁNDEZ-LEÓN R.; ROJAS-SOLÍS, D.; CONTRERAS-PÉREZ, M.; OROZCO-MOSQUEDA, M.D.C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; REYES, H.C. de la; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**, v.81, p.83–92, 2015.

HUANG, R.; CHE, H.J.; ZHANG, J.; YANG, L.; JIANG, D.H.; LI, G.Q. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. **Biological Control**, v.62, p.53–63, 2012.

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

ISLAM, M.D.; RASHEDUL, M.; MADHAIYAN, M.; HARI, P.; BORUAH, D.; YIM, W.; LEE, G.; SARAVANAN, V.S.; FU, Q.; HU, H.; SA, T.M. Characterization of plant growth promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.19, p.1213–1222, 2009.

JAYASHREE, R.; VASUDEVAN, N. Effect of tween 80 added to the soil on the degradation of endosulfan by *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, p. 203–210, 2007.

JHA, B.; THAKUR, M. C.; GONTIA, I.; ALBRECHT, V.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, n. 1, p. 62-72, 2009.

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

KARTHIKEYAN, V; GNANAMANICKAM, S.S. Biological control of *Setaria* blast (*Magnaporthe grisea*) with bacterial strains. **Crop Protection**, v.27, p.263–267, 2008.

KASANA, R.C., SALWAN, R., DHAR, H., DUTT, S., GULATI, A. A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v.57, p.503-507, 2008.

KEINATH, A.P.; BATSON, W.E.; CACERES, J.; ELLIOTT, M.L.; SUMNER, D.R.; BRANNEN, P.M.; ROTHROCK, S.; HUBER, D.M.; BENSON, D.M.; CONWAY, K.E.; SCHNEIDER, R.N.; MOTSENBOCKER, C.E.; CUBETA, M.A.; OWNLE, B.M.; CANADAY, C.H.; ADAMS, P.D.; BACKMAN, P.A.; FAJARDO, J. Evaluation of biological and chemical seed treatments to improve stand of snap bean across the southern United States. **Crop Protection**, v.19, p.501-509, 2000.

KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1229–1244, 2004.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, USA, v.44, n.2, p.301-307, 1954.

KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKAM, S. Biological Control of Rice Blast by *Pseudomonas fluorescens* Strain Pf 7–14: Evaluation of a Marker Gene and Formulations. **Biological Control**, v.13, p.158–165, 1998.

KUMARI, V.; SRIVASTAVA, J.S. Molecular and biochemical aspects of rhizobacterial ecology with special emphasis on biological control. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.535–543, 1999.

LAGZIAN, A.; SABERI RISEH, R.; KHODAYGAN, P.; SEDAGHATI, E.; DASHTI, H.. Introduced *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 as an important biocontrol agent for controlling *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* the causal agent of take-all disease in wheat. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, n.46, p.2104–2116, 2013.

LI, C.H.; SHI, L.; HAN, Q.; HU, H.L.; ZHAO, M.W.; TANG, C.M.; LI, S.P. Biocontrol of verticillium wilt and colonization of cotton plants by an endophytic bacterial isolate. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p.641-651, 2012.

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: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 317-330p.

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.; 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.

LUGTENBERG, B.; CHIN-A-WOENG, T.; BLOEMBERG, G.V. Microbe plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.81, p.373–383, 2002.

MALAVOLTA, V.M.A.; PARISI, J.J.D.; TAKADA, H.M. **Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos da semente, transmissão do patógeno as plântulas e produção.** *Summa Phytopathologica, Jaboticabal*, v.28, n 4, p.336-340, 2002.

MALIK, K.A.; BILAL, R.; MEZHNEZ, S. RASUL, G.; MIRZA, M.S.; ALI, S. Association of nitrogen fixing, plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant Soil**, v.194, p.37–44, 1997.

MANDELBAUM, R.T.; ALLAN, D.L.; WACKETT, L.P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the herbicide atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1451–1457, 1995.

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

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth promoting bacteria that confer resistance in tomato to salt stress. **Plant Physiology. Biochemical**, v.42, p. 565-572, 2004.

MAZURIER, S.; CORBERAND, T.; LEMANCEAU, P.; RAAIJMAKERS, J. M. 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. **ISME Journal**, v.3, p.977–991, 2009.

MINOTTO, E. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. 181f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MILLER, J.H. **Experiment in molecular genetics.** 2ed. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1974. 468p.

MOURA, A.B., PIEROBOM, C.R., NAVA, D.E. & AFONSO, A.P. Tratamento de sementes de arroz para seleção massal de procariontas potenciais antagonistas a *Bipolaris oryzae*. **Fitopatologia Brasileira** 23 (Suplemento), p.213. 1998.

MYRESIOTIS, C.K; VRYZAS, Z.; MOURKIDOU, E.P. Biodegradation of soil-applied pesticides by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on bacterial growth. **Biodegradation**, v. 23, p. 97–310, 2012.

NAIK, P.R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVEL, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphatesolubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, v.8, p.1-14, 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.

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.

OBANDA, D.N.; SHUPE, T.F. Biotransformation of tebuconazole by microorganisms: evidence of a common mechanism. **Wood and Fiber Science**, v. 41, p. 157–167, 2009.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M.L.; SAÑCHEZ-SALINAS, E. Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 26, p. 27–38, 2010.

OU, S.H. **Rice diseases**. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England, 1985. 380p.

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.

PIRT, S.J. **Principles of microbe and Cell cultivation**. Oxford, Boston: Blackwell Scientific, 1975. p.274.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. Arroz (*Oryza sativa* L.) Controle de doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIN, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997, v.1, p.51-79.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.C. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, 2006, 388p.

PRASHAR, P.; KAPOO, N.; SACHDEVA, S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. **Reviews Environment Science Biotechnology**, v.13, p.63-77, 2014.

PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L.E.; NEWMAN, D.K. Rethinking 'secondary metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. **Nature Chemical Biology**, v.2, p.71–78, 2006.

RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p.1158-1164, 1998.

RAVEN, P. H.; RAY, F. E.; SUSAN, E. E. **Biologia Vegetal**. 2ed, São Paulo: Guanabara Koogan, 1992.

RIBEIRO, A.S. **Doenças do arroz irrigado**. Pelotas: Embrapa-CPATB, 1988. 56p. (Circular Técnica 2).

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de enfermidades de plantas: procedimentos**. – Viçosa: Ed. UFV, 2007. 172p.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; MENDES, I.C de; JÚNIOR, F.B.R.; SANTOS, J.C.F.; HUNGRIA, M. Biomassa Microbiana do Solo: Fração mais ativa da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F.; SALTON, J.C. (Ed.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. p.163-198.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v.278, p.1-9, 2008.

SALEH-LAKHA, S.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria. In: van ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K; TREVORS, J.T. (Eds). **Modern soil microbiology**. CRC/Thomson Publishing, Boca Raton, FL/UK, p. 503-520, 2006.

SANTOS, V.B.; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M.V.; PAULETTO, E.A.; GOMES, A.S.; SILVA, G. Biomassa, atividade microbiana e teores de carbono e nitrogênio totais de um planossolo sob diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, p.333-338, 2004.

SARATHAMBAL, C.; ILAMURUGU, K.; BALACHANDAR, D.; CHINNADURAI, C.; GHARDE, Y. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. **Applied Soil Ecology**, v. 87, p. 1-1-, 2015.

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

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Annual Biochemical**, v.190, p.47-56, 1987.

SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p.639–648, 2004.

SHAHI, S.K.; RAI, A.K.; TYAGI, M.B.; SINHA, R.P.; KUMAR, A. Rhizosphere of rice plants harbor bacteria with multiple plant growth promoting features. **African Journal Biotechnology**, v.10, p. 296–8305, 2011.

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

SHIMO,S.; INOUE, K.; KITAGAWA, H.; YAMASAKI, M.; TSUSHIMA, S.; PARK, P.;IKEDA, K. Biological control for rice blast disease by employing detachment action with gelatinolytic bacteria. **Biological Control**, v. 55 , p.85–91, 2010.

SINGH, R.; KALRA, A.; RAVISH, B.S.; DIVYA, S.; PARAMESWARAN, T.N.; SRINIVAS, K.V.N.S.; BAGYARAJ, D.J. Effect of potential bioinoculants and organic manures on root-rot and wilt, growth, yield and quality of organically grown *Coleus forskohlii* in a semiarid tropical region of Bangalore (India). **Plant Pathology**. n.61, p.700–708, 2012.

SMITH, J.L.; PAUL, E.A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: BOLLAG, J.; STOTZKY, D.G. (Ed.). **Soil biochemistry**. New York: M. Dekker, 1990. v.6, p.357-396.

SOARES, V.N.; TILLMANN, M.A.A.; MOURA, A.B.; ZANATTA, Z.G.C.N. Physiological potential of rice seeds treated with rhizobacteria or the insecticide thiamethoxam. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.4, p. 563 – 572, 2012.

SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO**, 28, Bento Gonçalves-RS. Porto Alegre-RS. 2010. 188p.

SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO**, 29 2014, Gravatal, SC –Itajaí, SC, 2012. 179p.

SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO**, 30.: 2014, Bento Gonçalves, RS. 2014. 189p.

SOUZA JÚNIOR, I.T.; MOURA, A.B.; SCHAFER, 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.

SOUZA, R. de; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P.B. da; MEYER, J.; VARGAS, L.K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L.M.P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant Soil**, v.366, p.585-603, 2013.

SOUZA, R. J.; CARVALHO, J. G. Efeito de doses de nitrogênio aplicadas no solo e níveis de cálcio aplicados via foliar sobre o teor e o acúmulo de micronutrientes em alface americana. **Ciência Agrotécnica**, v.24, p.905-916, 2000.

STOTZKY, G. Microbial respiration. In: *Methods of soil analysis*, Madison: **American Society of Agronomy**, v.2, p.1551-1572, 1965.

STRECK, E.V.; KAMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KL, TM E.; NASCIMENTO, P.C.; SCHNEIDER, P. **Solos do Rio Grande do Sul**. – Porto Alegre, EMATER/RS; UFRGS, 2002.

TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia. Departamento de Solos Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS, 1995. 174p.

THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal Bacteriology**, n.170, p.3499– 3508, 1988.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos em Ciência do Solo**, v.2, p.196-275, 2002.

TURNER, T.R.; JAMES, E.K.; POOLE, P.S. The plant microbiome. **Genome Biology**, p.14:1–10, 2013.

TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. In: RYDER, M.H. (ed) **Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria**. CSIRO, p.104–109, 1994.

USDA- NRCS (United States Department of Agriculture). *Guidelines for Soil Quality Assessment in Conservation Planning*. 2001. Disponível em: [http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_DOCUMENTS/nrcs142p2\\_051259.pdf](http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_051259.pdf). Acesso em: 10 de mar de 2015.

VAN LOON, L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v.3, p.243-254, 2007.

VARGAS, L.K.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S. Alterações microbianas no solo durante o ciclo do milho nos sistemas plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.749-755, 2004.

VEGA, N.W.O. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v.60, p.3621–3643, 2007.

VENCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Na extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biological Biochemical**, v.19, p.703-707, 1987.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant & Soil* v. 255, p.571- 586, 2003

VIDHYSEKARAN, 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.

VON BODMAN, S.B.; BAUER, W.D.; COPLIN, D.L. *Quorum sensing* in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 41, p.455-482, 2003.

WANG, E. T.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Sesbania herbacea* – *Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea* nodulating rhizobia in different environments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 1, p. 25–32, 2000.

WARDLE, D.A. Metodologia para quantificação da biomassa microbiana do solo. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRPA, 1994. p.419-436.

WELLER, D.M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. **Phytopathology**, n.97, p.250–256, 2007.

WEYENS, N.; VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S.; VANGRONSVELD, J. Phytoremediation: planteendophyte partnerships take the challenge. **Curr Opin Biotechnol** 20:248–254, 2009.

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

WIWATTANAPATAPEE, R.; CHUMTHONG, A.; PENGGOO, A.; KANJANAMANEESATHIAN M. Effervescent fast-disintegrating bacterial formulation for biological control of rice sheath blight. **Journal of Controlled Release**, v.119, p.229-235, 2007.

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.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends Plant Science**, v.14, p.1-4, 2009.

YANG, J.H.; LIU, H.X.; ZHU, G.M.; PAN, Y.L.; XU, L.P.; GUO, J.H. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 91–104, 2008.

YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant Soil**, v. 336, p.129–142, 2010

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; DEBRUIJN, F.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant Soil**, v.194, p.99–114, 1997.

YAO, L.; WU, Z.; ZHENG, Y.; KALEEM, I.; LI, C. Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 46, n. 1, p. 49-54, 2010.

YOUNG, V.R.; PELLET, P.L. Plant proteins in relation to human protein and amino-acid nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.14, n.4, p.120-1212, 1997.

ZIBILSKE, L.M. Carbon mineralization. In: WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMLEY, P.J. (Ed). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. P.836-864. (Special publication, 5). Part 2: Microbiological and biochemical properties.