

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

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE ARROZ COM POTENCIAL DE
BIOCONTROLE DA BRUSONE E DA MANCHA-PARDA EM
CONDIÇÕES DE CAMPO

Flávia Miyuki Tomita
Engenheira Agrônoma/UNESP

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Tomita, Flávia Miyuki
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE ARROZ COM POTENCIAL DE
BIOCONTROLE DA BRUSONE E DA MANCHA-PARDA EM CONDIÇÕES
DE CAMPO / Flávia Miyuki Tomita. -- 2019.
52 f.
Orientador: Roberto Lanna Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2019.

1. Magnaporthe oryzae. 2. Cochliobolus miyabeanus.
3. Oryza sativa. 4. Controle Biológico. I. Lanna
Filho, Roberto, orient. II. Título.

FLÁVIA MIYUKI TOMITA
Engenheira Agrônoma - UNESP
Especialista em Agronomia - UFPel

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

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

Aprovado em: 26.08.2019
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 18.02.2020
Por

ROBERTO LANNA FILHO
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI
PPG Fitotecnia/UFRGS

CLAUDIO OGOSHI
EPAGRI/SC

PAULO AFONSO FERREIRA
UFMT/MT

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

“Acreditar que você pode, já é meio caminho andado.”
(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização do mestrado.

Ao meu marido Rodrigo e filha Bia, pelo apoio e compreensão.

Aos meus pais Yoshio e Lena e minhas irmãs Eiko e Shizue, pelo incentivo e amor.

Aos amigos Andréia, Bruno, Larissa e Nathália que mesmo de longe sempre se fizeram presentes na minha vida.

Aos amigos Neiva, Danielle, Gabriela, Débora, Fernando, Daniel, Camila, Jossana, Paulo Régis e Lidiane, pela ajuda e pela amizade.

Ao meu orientador Dr. Roberto Lanna Filho, pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

As colegas de pós-graduação Fabiane e Indianara pela ajuda e carinho.

Ao técnico Rafael pela dedicação e paciência e ao Professor Edson Bertolini pelo apoio.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal e Biocontrole do Departamento de Fitossanidade, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar meu estudo.

Ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) pela liberação para o mestrado.

À equipe da Estação Experimental do Arroz (IRGA), pela área experimental e a equipe da Seção de Produção de Sementes pelo apoio em campo.

Aos Drs. Cláudio Ogoshi, José Antônio Martinelli e Paulo Afonso Ferreira, por avaliarem o trabalho.

Enfim, a todos aqueles que fizeram e fazem parte da minha jornada. Meu muito obrigada e minha gratidão!

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE ARROZ COM POTENCIAL DE BIOCONTROLE DA BRUSONE E DA MANCHA PARDA EM CONDIÇÕES DE CAMPO¹

Autor: Flávia Miyuki Tomita
Orientador: Prof. Roberto Lanna Filho

RESUMO

A cultura do arroz é essencial para a segurança alimentar e nutricional para mais da metade da população mundial. Entre os fatores que limitam a produtividade do arroz irrigado, destaca-se a ocorrência de doenças: a brusone (*Magnaporthe oryzae*) e a mancha-parda (*Cochliobolus miyabeanus*) têm causado perdas nas principais regiões produtoras do estado do Rio Grande do Sul. A resistência de novas cultivares foi suplantada pelo aumento da frequência de patógenos resistentes aos agrotóxicos. Neste caso, o controle biológico se apresenta como alternativa para preservação do meio ambiente. Neste contexto, a proposição deste estudo foi avaliar, a campo, bactérias endofíticas autóctones de arroz contra os patógenos *M. oryzae* e *C. miyabeanus*. Para tanto, foram testados os isolados de 11 bactérias endofíticas contra a brusone sobre a cultivar GURI INTA CL e seis isolados de bactérias endofíticas contra a mancha-parda sobre a cultivar IRGA 424 RI. Dois métodos de aplicação foram utilizados, bacterização de sementes e pulverização de plantas. O primeiro experimento foi conduzido com a exposição das sementes aos isolados e a água (controle negativo). O segundo contou com a bacterização das sementes e pulverização das plantas, bem como o uso de um fungicida (controle positivo) e à água (controle negativo). A identificação dos isolados foi baseada nas sequências parciais da região 16S rDNA. Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey. Os gêneros identificados foram: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Providencia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* e *Fictibacillus*. Com base nos resultados encontrados neste estudo, dentre os onze isolados das bactérias endofíticas avaliadas para o controle da brusone, pela bacterização de sementes, cinco se destacaram por reduzir a severidade da doença. Entretanto, devido às características patogênicas de algumas espécies identificadas, somente a cepa *Pseudomonas* sp. RS239 apresentou potencial para utilização. Nos ensaios para o controle de mancha-parda, por bacterização de sementes e plantas, entre os seis isolados avaliados, quatro reduziram a severidade da doença quando comparados ao controle. No entanto, a cepa com maior potencial, *Enterobacter* sp. RS127, não apresenta características desejáveis para a idealização de um bioproduto, devido ao caráter patogênico ao homem. Dessa forma, apresenta potencial para utilização no controle da mancha-parda, *Pseudomonas manteilii* RS100, *Pseudomonas* sp. RS236 e *Fictibacillus* sp. RS344.

Palavras-chave: *Magnaporthe oryzae*; *Cochliobolus miyabeanus*, *Oryza sativa*; Controle biológico

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do RioGrande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (52f.) Agosto, 2019.

ENDOPHYTIC RICE BACTERIA WITH BIOCONTROL POTENTIAL OF BROWN SPOT AND BLAST RICE IN FIELD CONDITIONS¹

Author: Flávia Miyuki Tomita

Advisor: Roberto Lanna Filho

ABSTRACT

Rice cultivation is essential for food and nutritional security for more than half of the world's population. Among the factors that limit the productivity of irrigated rice, the occurrence of diseases stands out: blast rice (*Magnaporthe oryzae*) and brown spot (*Cochliobolus miyabeanus*) have caused major losses in the main producing regions of the state of Rio Grande do Sul. The resistance of new cultivars was surpassed by the increase of pesticide resistant pathotypes frequency. In this case, biological control is presented as alternative environment preservation. The purpose of this study was to evaluate, in the field, autochthonous rice endophytic bacteria against pathogens *M. oryzae* and *C. miyabeanus* in vitro and under greenhouse conditions in previous studies. For this purpose, strains of 11 blast rice endophytic bacteria in the cv. GURI INTA CL and six strains of brown spot endophytic bacteria in the cv. IRGA 424 RI were tested. Two application methods were used, seed and plant bacterization. The first experiment was conducted with seed exposure to strains and water (negative control). In the second, seeds and plants were bacterized and one fungicide was used as positive control and water as negative control. Strains identification was based on partial sequences of the 16S rDNA region. The results were submitted to variance analysis and compared by Tukey's test. The identified endophytic genera were *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Providencia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* and *Fictibacillus*. Based on the results found in this study, among the eleven isolates of endophytic bacteria evaluated for blast control by seed bacterization, five stood out for reducing disease severity. However, due to the pathogenic characteristics of some identified species, only the *Pseudomonas* sp. RS239 showed potential for use. In the tests for the control of brown spot by seed and plant bacterization, among the six isolates evaluated, four reduced the severity of the disease when compared to the control. However, the strain with the highest potential, *Enterobacter* sp. RS127, does not present desirable characteristics for the idealization of a bioproduct, due to the pathogenic character to man. Thus, it has potential for use in the control of brown spot, *Pseudomonas mantilii* RS100, *Pseudomonas* sp. RS236 and *Fictibacillus* sp. RS344.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; *Cochliobolus miyabeanus*, *Oryza sativa*; Biological Control.

¹ Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (52p.) August, 2019.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 A cultura do arroz.....	15
2.2 Brusone do arroz	15
2.3 Mancha-parda em arroz.....	17
2.4 Bactérias endofíticas como agentes de biocontrole.....	18
3 REFERÊNCIAS	22
4 ARTIGO 1.....	29
4.1 Resumo	30
4.2 Introdução.....	31
4.3 Material e métodos	33
4.3.1 Obtenção e cultivo dos microrganismos	33
4.3.2 Condições de campo e delineamento experimental	33
4.3.2.1 Bacterização de sementes pelos endofíticos na safra 2017/18.....	34
4.3.2.2 Bacterização de sementes e plantas pelos endofíticos na safra 2018/19.....	35
4.3.3 Extração do DNA bacteriano	36
4.3.4 Amplificação do fragmento gênico 16S rDNA.....	36
4.3.5 Correlação filogenética de 16S rDNA	36
4.3.6 Coleta dos dados meteorológicos.....	37
4.3.7 Análise estatística.....	37
4.4 Resultados	38
4.4.1. Biocontrole das doenças por bacterização de sementes na safra 2017/18	38
4.4.2. Biocontrole da mancha-parda por bacterização de sementes e plantas na safra 2018/19	39
4.4.3. Identificação dos isolados endofíticos	40
4.4.4. Análise meteorológica.....	41
4.5. Discussão.....	42
4.6. Considerações Finais	46
4.7. Referências.....	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

RELAÇÃO DE TABELAS

ARTIGO 1

1. Identificação das bactérias endofíticas isoladas de plantas de arroz, por comparação das sequências no banco de dados GenBank.....

Página

38

RELAÇÃO DE FIGURAS

ARTIGO 1

Página

1. Severidade da brusone causada por *Magnaporthe oryzae*, sobre plantas de arroz da cv. GURI INTA CL oriundas de sementes tratadas com os isolados RS36, RS51, RS95, RS98, RS127, RS180, RS239, RS257, RS269, RS307, RS343 e o controle (água). As colunas representam as médias de três repetições na safra 2017/18, Cachoeirinha-RS. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)..... 36
2. Severidade da mancha-parda causada por *Cochliobolus miyabeanus*, sobre plantas de arroz da cv. IRGA 424 RI oriundas de sementes tratadas com os isolados RS81, RS100, RS121, RS127, RS236, RS344 e o controle (água). As colunas representam as médias de três repetições na safra 2017/18, Cachoeirinha-RS. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)..... 37
3. Severidade da mancha-parda causada por *Cochliobolus miyabeanus*, sobre plantas de arroz da cv. IRGA 424 RI oriundas de sementes tratadas e pulverizadas com os isolados RS81, RS100, RS121, RS127, RS236, RS344, trifloxistrobina + tebuconazol e água (controle). As colunas representam as médias de três repetições na safra 2018/1, Cachoeirinha-RS. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)..... 38
4. Árvore filogenética baseada na análise de sequência parcial dos genes 16S rDNA, mostrando o agrupamento das bactérias endofíticas isoladas de arroz obtidas no GenBank. A árvore foi gerada aplicando o método vizinho mais próximo pelo *software* MEGA (Tamura *et al.*, 2007). Os números nos nós indicam valores de *bootstrap* em porcentagem (1000 *bootstraps*)..... 39
5. Dados de temperatura máxima e mínima do ar e da precipitação pluvial durante a realização dos experimentos a campo, para os ensaios com sementes e plantas de arroz bacterizadas com as suspensões das endofíticas para o controle da brusone e da mancha-parda, na Estação Experimental do Arroz, em Cachoeirinha/RS, nas safras 2017/18 (a) e 2018/19 (b)..... 40

1 INTRODUÇÃO GERAL

No mercado internacional, segundo dados do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2019), a produção mundial de arroz base beneficiado ficará em 497,82 milhões de toneladas na Safra 2019/20, retração de aproximadamente 1,3 milhões de toneladas em relação à safra 2018/19. Sobre o consumo, estima-se um significativo incremento de 9,2 milhões de toneladas, em meio a um aumento da demanda africana pelo grão. O Brasil é responsável por 76% da produção do bloco e se destaca como o maior mercado consumidor, com uma demanda estimada acima dos 11 milhões de toneladas. A Região Sul é responsável por 80% da produção nacional, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor do país, com um total de área semeada de 984.081 ha e uma produção total de 7.241.458 toneladas de arroz na safra 2018/19 (CONAB, 2019).

Entre os fatores que limitam a produtividade do arroz irrigado, destaca-se a ocorrência de doenças. No estado do Rio Grande do Sul, o arroz irrigado é atacado por diversas doenças, as quais podem diminuir a produtividade e a qualidade dos grãos colhidos (SOSBAI, 2018). Dentre as principais doenças, a brusone (*Magnaporthe oryzae* B.C. Couch; anamorfo = *Pyricularia oryzae* Cavara) e a mancha-parda [*Cochliobolus miyabeanus* (S. Ito & Kurib) Drechsler ex Dastur; anamorfo = *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan)] têm causado perdas nas principais regiões produtoras do estado (SOSBAI, 2018). A brusone do arroz foi relatada em aproximadamente 85 países (Kato, 2001; Besi *et al.*, 2009). A perda de rendimento dos grãos devida à brusone do arroz varia entre 10-30% ao ano nos vários países produtores da cultura (Skamnioti & Gurr, 2009; Ashkani *et al.*, 2015). Atualmente, a doença vem causando sérios problemas na África subsaariana (Kihoro *et al.*, 2013), bem como em todo o sul da Ásia e da

América do Sul (Martin-Urdiroz *et al.*, 2016). O fungo tem a capacidade de infectar as raízes da planta de arroz, mas a infecção eventualmente se espalha para os tecidos aéreos (Dufresne & Osbourn, 2001; Sesma & Osbourn, 2004).

A mancha-parda é a segunda doença fúngica de maior importância para a cultura no Brasil (Nunes *et al.*, 2004). No globo, tem ocorrência relatada em todos os países produtores de arroz (Khalili *et al.*, 2012). Em 2011, a doença foi classificada mundialmente como a terceira mais importante da cultura, perdendo apenas para a mancha-amarela do arroz causada pelo *Rice yellow mottle virus* (RYMV) e a brusone das folhas (Adur *et al.*, 2011). Os grãos infectados pela mancha-parda tornam-se inadequados para o consumo humano e o fungo pode permanecer viável por até quatro anos na semente (Barnwal *et al.*, 2013). Os sintomas da doença aparecem principalmente nas folhas no estágio inicial. As lesões em folha reduzem a área fotossintética e a absorção de nutrientes, o que resulta na diminuição dos nós de perfilhamento. Outras partes da planta podem ser infectadas, tais como o coleótilo, a bainha das folhas, os ramos da panícula e as glumas. O fungo *C. miyabeanus* pode causar grandes perdas em condições favoráveis para a ocorrência de epidemias (SHAO-MWALYEGO; KAYENE; MGHOGHO¹, 2011 apud NGAILO *et al.*, 2016).

O manejo integrado de doenças é essencial para o controle da brusone e da mancha-parda, os quais são inseridos nas práticas de utilização de cultivares resistentes, uso de controle químico, equilíbrio da nutrição mineral, manejo adequado da irrigação e uso de sementes saudáveis ou tratadas. Além disso, a alternância no uso de cultivares, a semeadura dentro da época recomendada e a utilização de adequada densidade de semeadura, têm por princípio, reduzir a severidade de doenças (Prabhu & Filippi, 2006; Shabana *et al.*, 2008; Skamnioti & Gurr, 2009; SOSBAI, 2018).

Nos últimos anos houve um aumento do uso de fungicidas nas áreas arroteiras, pois foram utilizadas cultivares não resistentes às doenças, principalmente à brusone (CBTT,

¹SHAO-MWALYEGO, F. S.; KAYEKE, J. M.; MGHOGHO, R. M., 2011 *apud* NGAILO *et al.*, 2016.

2011). As consequências negativas do uso excessivo de agrotóxicos são reportadas por diversos autores, que salientam para os malefícios causados aos homens, animais e ambiente (Cuevas, 2001; Costa *et al.*, 2012; Sambuichi *et al.* 2012; Suprpta, 2012; Yoon *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Neste caso, o controle biológico se apresenta como alternativa para a preservação do meio ambiente (Vessey, 2003).

Os micro-organismos benéficos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas apenas no século XX, no final dos anos 70, começaram a ser tratados com ênfase em estudos científicos (Azevedo *et al.*, 2000). Atualmente, inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de controlar doenças causadas por fitobactérias, fitofungos, fitonematoides e fitovírus em diferentes culturas (Palazzini *et al.*, 2016). Resultados promissores para o controle biológico da brusone são relatados com isolados bacterianos dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (Chatterjee *et al.*, 1996). Há vários gêneros de bactérias que exercem efeitos benéficos para o desenvolvimento da planta, como *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Thiobacillus* (Fravel, 2005). Numerosas espécies de *Bacillus* são conhecidas por melhorar a saúde vegetal e a produtividade por três mecanismos ecológicos diferentes: antagonismo, indução de resistência e solubilização de nutrientes (McSpadden Gardener, 2004).

No tocante as bactérias endofíticas, estudos vêm mostrando a potencialidade desses micróbios em controlar doenças em diferentes culturas agronomicamente importantes (Lanna-Filho *et al.*, 2017; Muthukumar *et al.*, 2017; Akbaba e Ozaktan, 2018; Suryanto *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2019). Além disso, podem estimular o crescimento das plantas (Oliveira *et al.*, 2003; Kuss *et al.*, 2007), potencializando as suas atividades metabólicas e otimizando a produção de energia (Palazzini *et al.*, 2016). Os principais mecanismos de biocontrole elucidados para as endofíticas podem atuar de forma direta ou indireta sobre patógenos, atenuando a severidade da doença (Alström & Van Vuurde, 2001; Kloepper & Ryu, 2005;

Hong & Park, 2016; Lanna-Filho *et al.* 2017; Khare *et al.*, 2018). Desta forma, os fenômenos de antibiose, competição (por espaço e nutrientes) e indução de resistência são os mais comumente desempenhados por esses microrganismos, em associação com plantas (Kloepper & Ryu, 2006; Li *et al.*, 2012; Lugtenberg *et al.*, 2016; Chowdhury *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2018; Latz *et al.*, 2018).

Os endofíticos são micro-organismos versáteis na adaptabilidade às condições do ambiente e multifacetados no emprego dos mecanismos de biocontrole, e podem ser empregadas na agricultura em detrimento à produção saudável de alimentos. Isto porque podem ser incluídos em programas de manejo de doenças, associados a outras estratégias de controle que vislumbrem a redução no uso de agrotóxicos. No entanto, raros são os estudos sobre a ação das bactérias endofíticas contra os patógenos em condições de campo (Faltin *et al.*, 2004; Tjamos *et al.*, 2004). Isto torna obscura a compreensão do comportamento desses micróbios em confronto com as condições inóspitas do ambiente ou no controle de doenças. Notadamente, estudos desta natureza abririam possibilidades para o desenvolvimento de bioformulados à base de bactérias endofíticas que possam controlar com eficiência a brusone e da mancha-parda em arroz. Neste contexto, a proposição deste estudo foi testar em condições de campo a atividade biocontroladora de bactérias endofíticas, que obtiveram sucesso contra os patógenos *M. oryzae* e *C. miyabeanus in vitro* e em condições de casa-de-vegetação em estudos anteriores (Pozzebon, 2015).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do arroz

O arroz é uma planta herbácea, anual, aquática ou hidrófila. Pertencente à divisão das angiospermas, grupo das monocotiledôneas, família Poaceae, tribo Oryzea e gênero *Oryza* (NCBI TAXONOMY, 2017), que engloba sete espécies, na qual duas de arroz cultivado, *O. sativa* L. (arroz asiático) e *O. glaberrima* Steud (arroz africano) e cinco silvestres: *O. rufipogon* Griff., *O. longistaminata* A.Chev. & Roehrich, *O. barthii* A.Chev., *O. glumaepatula* Steud. e *O. meridionalis* Ng. (Dias neto, 2008). O arroz está classificado no grupo das plantas com sistema fotossintético C3 e adaptada ao ambiente aquático. Esta adaptação é devida à presença de aerênquima nos colmos e nas raízes, que possibilita a passagem de oxigênio do ar para a rizosfera (SOSBAI 2018).

Segundo dados da CONAB (2019), o cultivo do arroz no Brasil tem se reduzido ao longo dos anos. Nas últimas 10 safras, a área cultivada com a cultura reduziu em aproximadamente 38%, sobretudo em áreas de sequeiro, uma vez que o produtor tem optado por culturas mais rentáveis. Apesar da produção não ter sofrido grandes variações neste período, o rizicultor nacional tem mantido a produção ajustada ao consumo, incrementando a produtividade com utilização de um melhor pacote tecnológico. No Brasil, o salto de produtividade de grãos de arroz entre as safras 2000/01 e 2017/18 foi de 91%, de 3.197 para 6.118 kg/ha (SOSBAI, 2018).

2.2 Brusone do arroz

O agente causal da brusone do arroz, *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch (anamorfo =

Pyricularia oryzae Cavara), está entre os patógenos mais importantes do mundo (Dean *et al.*, 2012). Apresenta conídios piriformes, obclavados, com base circular e ápice fino, levemente escuros, hialinos e medindo de 17-23 µm por 8-11 µm. Os conídios apresentam dois septos, os conidióforos são longos, septados, simples ou em pequenos feixes e o conídio geralmente germina a partir da célula apical ou basal. A temperatura ideal para o crescimento micelial e esporulação, em meio de cultura, gira em torno de 28 °C. Em relação à germinação, temperaturas entre 25 e 28 °C favorecem o processo (Bedendo & Prabhu, 2005).

No Brasil, é considerado o patógeno mais importante da cultura, reduzindo a produção tanto de arroz de terras altas, quanto de arroz irrigado (Malavolta *et al.*, 2009). O ciclo da doença tem início com a produção dos conídios quando a umidade do ar é superior a 93% e, geralmente, são liberados e disseminados durante a noite (Prabhu & Filippi, 2006). A disseminação de conídios ocorre pela ação do vento e, logo após, ocorre a pré-penetração (Ribeiro, 1988). Segundo Prabhu & Filippi (2006), depois de fixados no hospedeiro, os conídios germinam e formam o tubo germinativo. Este, por sua vez, diferencia-se em uma célula de infecção especializada, denominada apressório. Posteriormente, a penetração ocorre na epiderme da folha pelo rompimento da cutícula e da formação da hifa de infecção. É um patógeno policíclico e hemibiotrófico (Ou, 1985), o metabolismo celular é desestruturado e tem início a formação de lesões: o ciclo do patógeno torna-se completo em cinco dias (Ding *et al.*, 2009). O potencial destrutivo desta doença é tão grande que as lavouras de arroz que apresentam severidade acima de 30%, geralmente são abandonadas, devido aos danos econômicos causados (Lucas *et al.*, 2009).

Os sintomas nas folhas iniciam-se com a formação de pequenas lesões necróticas, de coloração marrom e centro cinza ou esbranquiçado (Bedendo & Prabhu, 2005). As lesões evoluem para um formato elíptico, de centro cinza e bordo purpuro-avermelhado. Em condições mais avançadas da doença, pode haver redução na altura das plantas e no número de perfilhos, resultando em menor quantidade de grãos e índice de colheita (Bedendo &

Prabhu, 2005). Na região dos nós e colmos, é possível detectar manchas úmidas que escurecem do castanho ao negro, podendo quebrar os colmos nas regiões na qual existem necroses. No colo da panícula, as manchas de coloração castanha envolvem o último nó, em forma de anel, e prolongam-se pela ráquis, ramificações e pedicelos da espiguetta. Devido às lesões ao nível do colo, a ráquis quebra e a panícula fica pendente. Em ataques muito severos da doença, as panículas já emergem infectadas, tornando-se brancas antes da maturação (Barros-Gomes & Rocha, 2006). Atualmente, o controle da brusone é baseado no manejo que integra o controle químico, a resistência genética e os tratos culturais. No Brasil, 76 produtos estão registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o uso na cultura contra o patógeno. Os principais grupos químicos são os triazóis, estrobirulinas e benzotiazóis (MAPA, 2019).

2.3 Mancha-parda em arroz

A mancha-parda, causada pelo fungo *C. miyabeanus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur [anamorfo =*Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker], é apontada como uma doença secundária, mas que pode causar danos significativos à produtividade de grãos de arroz irrigado na região Sul do Brasil, conforme relatos da última década (Grohs *et al.*, 2010). Apresenta micélio cinza a cinza-esverdeado escuro aveludado; conídios retos ou raramente curvos, cilíndricos ou largos no centro e castanhos claros a dourados, a germinação ocorre frequentemente nas duas extremidades (Quintana *et al.*, 2017). Os conidióforos são septados, isolados ou em pequenos grupos, reto ou flexível (Quintana *et al.*, 2017).

Os sintomas da doença geralmente manifestam-se nas folhas, logo após a floração, com manchas marrons a avermelhada, formato oval e distribuídas uniformemente sobre toda a superfície foliar das plantas. As lesões têm um ligeiro halo amarelo, por consequência da destruição dos cloroplastos associado à redução de fotoassimilados (Amorio & Cumagun, 2017; Quintana *et al.*, 2017). Nos grãos, as lesões têm coloração marrom-escura e, muitas

vezes, juntam-se, cobrindo-os completamente (Vidhyasekaran, 1986). A doença é favorecida por temperaturas entre 27 e 30 °C e por alta umidade relativa do ar, maior que 89%, pH entre 6,6-7,4, alternância de períodos claro e escuro para estimular sua esporulação (Ou, 1985). Além disso, alguns fatores, como o estresse por excesso ou falta de água, a baixa fertilidade do solo e o uso de nitrogênio em níveis muito altos ou muito baixos aumentam a suscetibilidade da planta à essa doença (Fillipi & Prabhu, 1998).

Os prejuízos são ocasionados pelas manchas enferrujadas em sementes, resultando em perda do potencial germinativo e morte de plântulas, com conseqüente redução do estande (Amorio & Cumagun, 2017). Nos grãos são observadas perdas na qualidade por apresentarem manchas de cor marrom escuro ou avermelhado (Ou, 1985). Em ataques severos, as manchas podem cobrir parcial ou totalmente a superfície dos grãos, causando o chochamento, redução do peso e gessamento (Malavolta *et al.*, 2007; Grohs *et al.*, 2010; Silva-Lobo & Filippi, 2017).

2.4 Bactérias endofíticas como agentes de biocontrole

O termo controle biológico pode ser descrito como a influência negativa de um micro-organismo (antagonista) sobre o outro (patógeno), eliminando ou reduzindo a quantidade de inóculo em determinado hospedeiro (Garrett, 1965; Baker & Cook, 1974; Mariano, 2000; Pal & Gardener 2006). O biocontrole é composto por três agentes: o patógeno, o hospedeiro e o antagonista, estando estes três componentes sob influência do ambiente. O antagonista é um agente biológico com potencial para interferir em processos vitais dos fitopatógenos (Mariano, 2000). Este controle pode ser de maneira direta, quando os antagonistas sintetizam metabólitos nocivos aos patógenos, podendo levar à morte ou à estagnação do seu crescimento (Poletto *et al.*, 2006; Rima *et al.*, 2012; Muccilli & Restuccia, 2015). Em relação às bactérias benéficas, as atividades antagônicas contra os patógenos podem ser alcançadas por três principais mecanismos: competição (por nutrientes e espaço), antibiose e parasitismo (Boukaew & Prasertsan, 2014).

Normalmente, o controle biológico oferece vantagens ao uso de métodos convencionais de controle como facilidade de aplicação, transformação ou recuperação de solos contaminados, além de não deixar resíduos no ambiente e não ser nocivo ao aplicador como ocorre com muitos agrotóxicos (Nunes, 2008). Destaca-se para a importância do uso do biocontrole, a boa eficiência na redução da quantidade e viabilidade do inóculo dos fitopatógenos e na atividade determinante da doença provocada por ele (Brum *et al.*, 2002). Dentre os principais organismos estudados no controle biológico de fitopatógenos, destacam-se as bactérias endofíticas. Estes microrganismos podem atuar na produção de compostos orgânicos que, de forma direta ou indireta, agem sobre a população de fitopatógenos e, podem estimular as plantas a crescerem e induzirem mecanismos de resistência (Hallmann *et al.*, 1998).

As bactérias interagem com o hospedeiro de forma patogênica, simbiótica, epifítica ou como endofíticos. Dentre esses quatro tipos de interações bactéria-planta, as interações endofíticas são as menos estudadas (Iniguez *et al.*, 2004). As bactérias endofíticas, quando no interior das plantas, normalmente não causam quaisquer alterações morfológicas significativas, como fazem as bactérias noduladoras (simbiontes) em plantas leguminosas. Igualmente, essas bactérias não causam quaisquer sintomas de doença, ao contrário dos fitopatógenos. Após se estabelecerem na planta, as bactérias endofíticas podem influenciar de maneira positiva o crescimento e a resistência a diferentes fatores de estresse abiótico como seca, inundação, salinidade etc. (Francis *et al.*, 2010; Glick, 2012).

Os efeitos promotores do crescimento nas plantas por endofíticas resultam do aumento das taxas de germinação, biomassa, área foliar, teor de clorofila, atividade hidráulica, comprimento de raízes e da parte aérea, bem como o controle biológico de fitopatógenos. Este último pode ser exercido por múltiplos mecanismos, tais como a antibiose, a competição por nutrientes e nicho ecológico, e a indução da resistência (Medeiros *et al.* 2018; Amorim & Pascholati, 2018). A colonização de plantas por bactérias endofíticas pode induzir várias

modificações na membrana celular vegetal, tais como formação de uma barreira estrutural em local de potencial ataque por fitopatógenos e deposição de calose, pectina, celulose e compostos fenólicos. Outro efeito comum da presença desses micro-organismos é a indução da produção de enzimas de defesa, como quitinases, peroxidases, β -1,3-glucanases, polifenol oxidase e fenilalanina amônia-liase (Malfanova *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2013; Lanna-Filho *et al.*, 2017). Muito além da habilidade de controlar doenças, as bactérias endofíticas têm grande potencial adaptativo frente às condições adversas do ambiente, por estarem em posições protegidas na planta. Isto possibilita com que elas permaneçam viáveis por um longo período, exercendo a atividade antagônica. Naturalmente, um bioformulado à base desses microrganismos pode ser utilizado com menor frequência, reduzindo os custos de aplicação e proporcionando maior período de atividade.

Os produtos naturais que são seguros para o meio ambiente e têm baixa toxicidade para os organismos vivos, estão ganhando interesse como fontes importantes para o desenvolvimento de bioformulados, e podem servir como substitutos efetivos dos fungicidas sintéticos (Martínez, 2012; Yoon *et al.*, 2013). O controle biológico, realizado pela aplicação de micro-organismos antagônicos, apresenta-se como uma alternativa viável em várias culturas, incluindo o arroz (Chandler *et al.*, 2015). Bactérias endofíticas vêm sendo consideradas potenciais agentes de controle biológico (Kaga *et al.*, 2008; Tantawy, 2009; Joshi *et al.*, 2011), para uso em culturas economicamente importantes em todo o mundo. No Brasil, o uso de agentes de biocontrole ou o seu estudo como alternativa ao uso de fungicidas no controle da brusone e da mancha-parda são pouco explorados. Em contrapartida, estudos com bactérias benéficas visando o controle de patógenos na cultura do arroz têm se tornado o foco de pesquisas de grandes centros em todo o mundo (Feng *et al.*, 2006; Tendulkar *et al.*, 2007; Gnanamanickam, 2009; Naik *et al.*, 2009; Gopalakrishnan *et al.*, 2010). Entretanto, o emprego delas no controle de doenças depende do sucesso do binômio endofítica-planta, pois fatores de reconhecimento envolvidos na interação podem afetar a viabilidade das

células em condições de campo (Lanna-Filho *et al.*, 2017). Estudos sobre a ecologia desses micro-organismos poderiam elucidar o papel dos agentes na interação, podendo trazer à luz o direcionamento dos processos de seleção dos endofíticos para cada espécie ou cultivar de interesse. Certamente, este é um dos maiores desafios para aqueles que idealizam a elaboração de um bioproduto à base de endofíticos bacterianos. Há muito para ser estudado sobre estes micro-organismos, para que se tenha produtos tão eficientes, quanto os fungicidas, e que sejam bem aceitos pelos produtores.

3 REFERÊNCIAS

- ADUR, O. S. E. *et al.* Farmers' knowledge and management of rice diseases under lowland ecology in Uganda. *In: BIENNIAL SCIENTIFIC CONFERENCE OF THE NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION, 2., 2014, Munyonyo, Uganda. [Proceedings ...].* Kampala: NARO, 2014. p. 80-81.
- AKBABA, M.; OZAKTAN, H. Biocontrol of angular leaf spot disease and colonization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by endophytic bacteria. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, Cairo, v. 28, [art.] 14, 2018.
- ALSTRÖM, S.; VAN VUURDE, J. W. L. Endophytic bacteria and biocontrol of plant diseases. *In: DE BOER, S. H. (ed.). Plant pathogenic bacteria.* Dordrecht: Springer, 2001. p. 60-67.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. *In: AMORIM, L.; REZENDE, A.M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.* 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 2018. 573 p.
- AMORIO, D. J. H.; CUMAGUN, C. J. R. Pathogenicity and cytological examination of adapted and non-adapted *Bipolaris* species on resistant and susceptible cultivars of rice and corn. **Mycosphere**, Chiang Rai, v.8, n. 3, p. 377-391, 2017. DOI: 10.5943/mycosphere/8/3/3.
- ASHKANI, S. *et al.* Genetic analysis of resistance to rice blast: a study on the inheritance of resistance to the blast disease pathogen in an F3 population of rice. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 163, n. 4, p. 300-309, 2015.
- AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, Chile, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BAKER, K.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens.** San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433 p.
- BARNWAL, M. K. *et al.* A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 136, n. 3, p. 443-457, 2013.
- BARROS-GOMES, H.; ROCHA, C. **Serviço nacional de avisos agrícolas: métodos de previsão e evolução dos inimigos das culturas - arroz.** Oeiras: Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2006. 65 p.
- BEDENDO, I.; PRABHU, A. Doenças do arroz (*Oryza sativa*). *In: KIMATI, H. et al. (ed.). Manual de fitopatologia.* 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.79-90.

BESI, M. I.; TUCKER, S. L.; SESMA, A. Magnaporthe and its relatives. *In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley, 2009. p. 1-9.

BOUKAEW, S.; PRASERTSAN, P. Suppression of rice sheath blight disease using a heat stable culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RM-1-138. **Crop Protect**, Guildford, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2014.

BRUM, L. E. B. *et al.* Temperatura, luminosidade e meio de cultura afetando a produção de esclerócios de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, n. 1, p. 1-7, 2002.

CBTT - COMISSÃO BRASILEIRA DE TRIGO E TRITICALE. **Informações técnicas para trigo e triticale-safra 2012**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 218 p.

CHANDLER, S. *et al.* Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 90, n. 1, p. 20-30, 2015.

CHATERGEE, S. H.; FREYD, J. J.; SHIFFRAR, M. Configural processing in the perception of apparent biological motion. **Journal of Experimental Psychology**, Lancaster, v. 22, n. 4, p. 916-929, 1996.

CHOWDHURY, N. S. *et al.* Cytotoxic naphthoquinone and azaanthraquinone derivatives from an endophytic *Fusarium solani*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 80, n. 4, p. 1173-1177, 2017.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra 2018/2019: sexto levantamento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, Brasília, v. 6, n. 6, p. 1-145, mar. 2019. Monitoramento agrícola. Projeto Observatório Agrícola. Disponível em: https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/24952_cd2f531372c01a06d768793ce5f6cab2. Acesso em: 25 mar. 2019.

COSTA, R. *et al.* Efeito de agrotóxicos usados na cultura do morangueiro sobre o predador *Phytoseiulus macropilis* (Banks) em laboratório, semicampo e campo no sul de Minas Gerais. **Revista Agroambiental**, Pouso Alegre, v. 4, n. 3, p. 1-12, 2012.

CUEVAS MEDINA, A. **Manejo integrado de plagas en el cultivo del arroz**. Bogotá, Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2001. 52 p.

DEAN, R. *et al.* The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DING, X. *et al.* A rice kinase-protein interaction map. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 3, p. 1478-1492, 2009.

DUFRESNE, M.; OSBOURN, A. E. Definition of tissue-specific and general requirements for plant infection in a phytopathogenic fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 300-307, 2001.

FALTIN, F. *et al.* Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 811-820,

2004.

FENG, Y. *et al.* Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 938-945, 2006.

FILLIPI, M. C.; PRABHU, A. S. Doenças do arroz e seu controle. *In*: BRESEGHELO, F.; STONE, L. F. **Tecnologia para o arroz de terras altas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1998. p. 139-156.

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

FRAVEL, D. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 337-359, 2005.

GARDENER, B. B. M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 11, p. 1252-1258, 2004.

GARRETT, S. D. Toward biological control of soil-borne plant pathogens. *In*: BAKER, K. F.; SNYDER, W. C. (ed.). **Ecology of soil-borne plant pathogens**: prelude to biological control. Berkeley: University of California, 1965. p. 4-17.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, Cairo, v. 2012, [art.] 963401, p. 1-15, 2012.

GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of rice blast. *In*: GNANAMANICKAM, S. S. **Biological control of rice diseases**. 8th ed. Dordrecht: Springer, 2009. p 53–65.

GOPALAKRISHNAN, S. *et al.* Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 27, n. 6, p. 1313–1321, 2010.

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

HALLMANN, J. *et al.* Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 7, p. 925–937, 1998.

HONG, C. E.; PARK, J. M. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art. **Plant Biotechnology Reports**, Tokyo, v. 10, n. 6, p. 353–357, 2016.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

JHA, V. *et al.* Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **The Lancet**, London, v. 382, n. 9888, p. 260-272, 2013.

JOSHI, P.; TYAGI, V.; BHATT, A. B. Characterization of rhizobacteria diversity isolated

from *Oryza sativa* cultivated at different altitude in north Himalaya. **Advances in Applied Science Research**, Udaipur, v. 2, n. 4, p. 208-216, 2011.

KAGA, H. *et al.* Rice seeds as sources of endophytic bacteria. **Microbes and Environments**, [Tagajo, Japan], v. 24, n. 2, p. 154-62, 2008.

KATO, H. Rice blast disease. **Pesticid Outlook**, Cambridge, p. 23–25, Feb. 2001.

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

KHAN, N. *et al.* Endophytic *Fusarium solani*: a rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. **Toxicology Reports**, [Ireland], v. 5, p. 970-976, 2018.

KHARE, E.; MISHRA, J.; ARORA, N. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.9, [art.] 2732, 2018.

KIHORO, J. *et al.* Investigating the impact of rice blast disease on the livelihood of the local farmers in greater Mwea region of Kenya. **SpringerPlus**, Cham, v. 2, n. 1, [art.] 308, p. 1-13, 2013.

KLOEPPER, J.; RYU, C.M. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *In*: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T. N. (ed.). **Microbial root endophytes**. Heidelberg: Springer, 2006. p. 33-52.

KUSS, A. V. *et al.* Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LANNA FILHO, R.; SOUZA, R. M.; ALVEZ, E. Induced resistance in tomato plants promoted by two endophytic bacilli against bacterial speck. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 42, p. 96-108, 2017.

LATZ, M. A. C. *et al.* Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. **Plant Ecology & Diversity**, Abingdon, v. 11, n. 5/6, p. 555-567, 2018.

LI, X-J. *et al.* Metabolites from *Aspergillus fumigates*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 13, p. 3424-3431, 2012.

LUCAS, J. A. *et al.* Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 404-410, 2009.

LUGTENBERG, B.; CARADUS, J. R.; JOHNSON, L. J. Fungal endophytes for sustainable crop production. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 92, n. 12, p. 1-17, 2016.

MALAVOLTA, V. M. A. *et al.* Incidência de fungos e quantificação de danos em sementes de genótipos de arroz. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 280-286, 2007.

MALAVOLTA, V. M. A. *et al.* Variabilidade patogênica do fungo *Pyricularia grisea* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 49-52, 2009.

MALFANOVA, N. *et al.* Is L-arabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp.? **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 195, n. 1, p. 9-17, 2013.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. [Base de dados AGROFIT]. Brasília, 2017. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 24 maio 2017.

MARIANO, R. L. R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: UFRPE, 2000. 171 p.

MARTÍNEZ, J. A. Natural fungicides obtained from plants. *In*: DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; ANNAMALAI, P. S. (ed.). **Fungicides for plant and animal diseases**. Rijeka: InTechOpen, 2012. p. 3-28.

MARTÍN-URDIROZ, M. *et al.* Investigating the biology of plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 90, p. 61-68, 2016.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 2018. 573 p.

MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective role of yeasts. **Microorganisms**, Bethesda, v. 3, n. 4, p. 588-611, 2015.

MUTHUKUMAR, A.; REGUNATHAN, U.; RAMASAMY, N. Role of bacterial endophytes in plant disease control. *In*: MAHESHWARI, D.; ANNAPURNA, K. (ed.). **Endophytes: crop productivity and protection**. Cham: Springer, 2017. v. 2, p. 133-161.

NAIK, B. S. *et al.* Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 3, p. 290-96, 2009.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Magnaporthe oryzae*. *In*: **Taxonomy database**. Bethesda: NCBI, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=318829&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock. Acesso em: 28 jun. 2017.

NGAILO, J. A. *et al.* Rice farming in the southern highlands of Tanzania: management practices, socio-economic roles and production constraints. **European Journal of Research in Social Sciences**, London, v. 4, n. 4, p. 28-39, 2016.

NUNES, C. D. M.; RIVEIRO, A.S.; TERRES, A. L. S. Principais doenças em arroz irrigado e seu controle. *In*: GOMES. A. S.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. (ed.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 579-622.

NUNES, S. P. O desenvolvimento da agricultura brasileira e mundial e a idéia de desenvolvimento rural. **Conjuntura Agrícola**, Curitiba, n. 157, mar. 2007. Disponível em: <http://www.deser.org.br/documentos/doc/DesenvolvimentoRural.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2017.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

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

PALAZZINI, J. M. *et al.* Biological control of *Fusarium* head blight of wheat, using formulated antagonists under field conditions in Argentina. **Biological Control**, Orlando, v. 94, p. 56-61, 2016.

POLETO, I. *et al.* Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causador de podridão-de-raízes em plantas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do Vale do Taquari-RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.

PRABHU, A. S.; FILLIPI, M. C. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 387 p.

QUINTANA, L. *et al.* Rice brownspot *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) shoemaker in Paraguay. **Tropical Plant Research**, Kanpur, v. 4, n. 3, p. 419-420, 2017.

RIBEIRO, A. S. **Doenças do arroz irrigado**. Pelotas: Embrapa-CPATB, 1988. 56 p. (Embrapa-CPATB. Circular Técnica, 19).

RIMA, H.; STEVE, L.; ISMAIL, F. Antimicrobial and probiotic properties of yeast: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, [art.] 421, 2012.

SAMBUICHI, R. H. R. *et al.* **A sustentabilidade ambiental da agropecuária brasileira: impactos, políticas públicas e desafios**. Rio de Janeiro: Ipea, 2012. Disponível em: http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td_1782.pdf. Acesso em: 20 set. 2016.

SESMA, A.; OSBOURN, A. E. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. **Nature**, New York, v. 431, p. 582-586, 2004.

SHABANA, Y. M.; ABDEL-FATTAH, G. M.; ISMAIL, A. E. Control of brown spot pathogen of rice (*Bipolaris oryzae*) using some phenolic antioxidants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 438-444, 2008.

SILVA-LOBO, V. L.; FILIPPI, M. C. C. **Manual de identificação de doenças da cultura do arroz**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2017. 14 p.

SKAMNIOTI, P.; GURR, S. J. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, p. 141-150, 2009.

SOSBAI - SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DO ARROZ IRRIGADO. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. *In*: REUNIÃO TÉCNICA DA

- CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 32., 2018, Farroupilha, RS. **Anais [...]**. Cachoeirinha: SOSBAI, 2018. 197 p.
- SUPRAPTA, D. N. Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. **ISSAAS Journal**, Los Baños, v. 18, p. 1-8, 2012.
- SURYANTO, D. *et al.* An assay on endophytic bacteria from corn and paddy to control damping-off of *Rhizoctonia solani* in corn seedling. **Journal of Physics: conference series**, Bristol, v.1116, [art.] 052068, 2018.
- TANTAWY, E. A. Acquainting with salt tolerant endophytic bacteria isolated from rice plant grown in highly saline soil in Egypt. **Internacional Journal of Academic Research**, Andhra Pradesh, India, v. 1, n. 2, p. 72-79, 2009.
- TENDULKAR, S. *et al.* Solation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2331-2339, 2007.
- TJAMOS, E. C. *et al.* Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 35-44, 2004.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Rice outlook**. Washington, DC, 2019. Disponível em: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/worldag-production/worldag-production.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2019
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p. 571-586, 2003.
- VIDHYASEKARAN, P.; BORROMEO, E. S.; MEW, T. W. Host-specific toxin production by *Helminthosporium oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 3, p. 261-266, 1986.
- WANG, Q. *et al.* Inhibitory effect of chitosan on growth of the fungal phytopathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia* rot of carrot. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 14, n. 4, p. 691-697, 2016.
- YOON, M. Y.; CHA, B.; KIM, J. C. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. **Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 29, p. 1-9, 2013.

4 ARTIGO 1

Bactérias endofíticas autóctones de arroz com o potencial para o biocontrole da mancha-parda e da brusone em condições de campo*

Flávia Miyuki Tomita¹& Roberto Lanna Filho¹

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

Autor para correspondência: Flávia Tomita, e-mail: flaviatomita@gmail.com

*Artigo formatado conforme as normas da Revista Tropical Plant Pathology

4.1 Resumo

O controle biológico pode ser utilizado como uma ferramenta para compor as práticas empregadas no manejo integrado de pragas e doenças que ocorrem no arroz, promovendo menor distúrbio ao meio ambiente. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a habilidade de isolados bacterianos endofíticos autóctones de arroz, em controlar a brusone e a mancha-parda em condições de campo. Para tal, foram testados 11 isolados bacterianos para o controle da brusone na cv. GURI INTA CL e seis para controle da mancha-parda na cv. IRGA 424 RI. Para o ensaio com a bacterização de sementes, foi utilizado o controle negativo (água). No ensaio com a bacterização de sementes e plantas foram usados os controles negativo (água) e positivo (fungicida). A identificação dos isolados testados foi baseada nas sequências parciais da região 16S rDNA. Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey. Pode-se concluir que dos 11 isolados avaliados para o controle da brusone, os isolados RS180, RS98, RS257, RS51 e RS239, caracterizados como *Enterobacter asburiae*, *Providencia* sp., *Enterobacter tabaci*, *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas* sp., respectivamente, reduziram a severidade da doença quando comparados ao controle. Para a mancha-parda, com a bacterização de sementes e plantas, dos seis isolados testados, RS344, RS236, RS121 e RS127, caracterizados como *Fictibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas hibiscicola* e *Enterobacter* sp., respectivamente, reduziram a severidade da doença em relação ao controle.

Palavras-chave: *Magnaporthe oryzae*; *Cochliobolus miyabeanus*, *Oryza sativa*; Controle biológico

4.2 Introdução

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, destacando-se como o principal alimento de mais da metade da população mundial (CONAB, 2019). No Brasil, sua produção ocorre em todo o país, mas tem maior concentração na Região Sul, que é responsável por quase 80% da oferta nacional (CONAB, 2019). No entanto, a ocorrência de doenças limita a produtividade do arroz irrigado podendo prejudicar a quantidade e a qualidade dos grãos colhidos (SOSBAI, 2018). Dentre as principais doenças, a brusone (*Magnaporthe oryzae* B.C. Couch; anamorfo = *Pyricularia oryzae* Cavara) e a mancha-parda [*Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler ex Datur; anamorfo = *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker] têm causado perdas vultosas nas principais regiões produtoras do estado (SOSBAI, 2018).

A perda de rendimento de grãos devida à brusone gira em torno de 10-30% ao ano nos principais países produtores da cultura e pode alcançar 50% durante as epidemias da doença (Skamnioti & Gurr, 2009; Ashkani et al., 2015). O potencial destrutivo desta doença é tão grande que as lavouras de arroz que apresentam severidades acima de 30%, geralmente são abandonadas, devido aos danos econômicos causados (Lucas et al., 2009). A mancha-parda é a segunda doença de maior relevância à cultura, podendo causar perdas de até 90% no rendimento (Sunder et al., 2014) e na qualidade dos grãos produzidos nas lavouras brasileiras (Prabhu & Pillipi, 2006; Celmer et al., 2007). O emprego de genótipos elites para a resistência às doenças têm resultado em insucesso no campo, pelo surgimento de novos patótipos capazes de suplantar as defesas das cultivares mais utilizadas (Bonman et al., 1992; Zeigler et al., 1994; Santos et al., 2002; Ashkani et al., 2015). O uso de fungicidas causam contaminação ambiental e perda de eficiência devido à resistência de

doenças (Gasparini & Viera, 2010; Silva et al., 2011; Spence et al., 2014a; Back et al., 2016).

O controle biológico pode ser utilizado como uma ferramenta para compor as práticas empregadas no manejo integrado de doenças, podendo resultar em menor custo quando produzido *on farm* (Monnerat et al., 2018; Mascarin et al., 2019; Semensatto, 2019). Além de serem mais seguros à saúde humana e ao meio ambiente, podem ser mais uma medida de controle inserida no manejo integrado, contribuindo para restringir e/ou reduzir o uso de fungicidas (Spence et al., 2014b; Mao et al., 2019). No tocante às bactérias benéficas, o emprego de endofíticas no controle de doenças de plantas pode ser uma alternativa viável dentro do manejo integrado de doenças (Lateef & Gueguim-Kana, 2015; Sangiogo et al., 2018). Estes micro-organismos apresentam múltiplos mecanismos de ação contra patógenos (Hallmann et al., 1997; Santos et al., 2012; Arruda et al., 2013; Martini et al., 2014; Sarma et al., 2014; Abdelrahman et al., 2016), podendo prevenir ou reduzir a ocorrência de doenças em diferentes culturas (Compant et al., 2010; Lanna-Filho, 2011). No entanto, estudos em condições de campo confrontando as bactérias endofíticas com os patógenos de ocorrência natural, são raros e muito pouco explorados (Faltin *et al.*, 2004; Tjamos *et al.*, 2004). A maioria dos estudos são realizados sob casa-de-vegetação (Ludwig et al., 2009; Zarandi et al., 2009; Li et al., 2011; Spence et al., 2014b), que não reproduzem as condições meteorológicas, ecológicas e biológicas do campo.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar bactérias endofíticas autóctones de arroz contra os fitopatógenos *M. oryzae* e *C. miyabeanus* sob condições de campo, utilizando os métodos de bacterização de sementes e pulverização de plantas.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Obtenção e cultivo dos microrganismos

As bactérias endofíticas foram obtidas da coleção de isolados do Laboratório de Bacteriologia Vegetal e Biocontrole da Universidade do Rio Grande do Sul - UFRGS. Os isolados eleitos para o estudo foram aqueles que obtiveram os melhores resultados contra os patógenos *Magnaporthe oryzae* e *Cochliobolus miyabeanus* em estudos anteriores, realizados em casa-de-vegetação (Pozzebon, 2015). Os isolados selecionados para o estudo contra a *M. oryzae* foram os RS36, RS51, RS95, RS98, RS127, RS180, RS239, RS257, RS269, RS307 e RS343. Em adição, no estudo contra o *C. miyabeanus* foram eleitos os isolados RS81, RS100, RS121, RS127, RS236 e RS344. Os endofíticos foram repicados da preservação em óleo mineral (Lelliott & Stead, 1987) para placas de Petri com meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e mantidos em incubadora (Sheker Tecnal, TE 420) a 28 °C por 48 h. Após crescimento, as células vegetativas foram mantidas por repicagem tubo-a-tubo (Tuite, 1969; Kiraly et al., 1970).

4.3.2 Condições de campo e delineamento experimental

Os experimentos de campo foram conduzidos na Estação Experimental do Arroz (IRGA), em Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brasil (29° 57' 03" S 51° 05' 38" O e altitude média de 10 m). O clima da região é do tipo subtropical úmido, conforme classificação de Köppen (Brasil, 1973). As temperaturas médias variam de 9,8 e 31,6 °C nos meses mais frio e quente do ano, respectivamente. A precipitação pluvial média anual é de 1450 mm e a disponibilidade de radiação solar máxima é de 21 MJ m⁻² dia⁻¹ no mês de dezembro (INMET, 2019). O solo no qual os experimentos foram conduzidos foi classificado como Gleissolo Háplico Ta distrófico (EMBRAPA, 1999) preparado de forma convencional, com uma aração e duas gradagens. Para que houvesse um estímulo à ocorrência das doenças alvos foram empregadas altas densidade de semeadura e adubação nitrogenada (150 kg ha⁻¹). A semeadura do arroz nos experimentos foi realizada em 14 de dezembro de 2017 e em 15 de dezembro de

2018, épocas consideradas tardias para a cultura. Foram selecionadas cultivares suscetíveis para cada doença, GURI INTA CL, para a brusone, e IRGA 424RI, para a mancha-parda.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 3 repetições e dez plantas representado a unidade experimental. Os tratamentos consistiram de 11 isolados para o controle da brusone sobre a cv. GURI INTA CL e seis para o controle da mancha-parda sobre a cv. IRGA 424 RI. A água foi utilizada como controle negativo para os experimentos conduzidos nas safras de 2017/18 e 2018/19. Um tratamento foi incluído no experimento da 2018/19, o controle positivo (trifloxistrobina + tebuconazol). As parcelas foram constituídas por duas fileiras de 15 m cada. Com área de 4,5 m² (0,3 × 15 m), com o espaçamento de 0,3 × 0,2 m. Foram eliminadas duas linhas de bordaduras nos blocos e uma planta nas extremidades das linhas.

4.3.2.1 Bacterização de sementes pelos endofíticos na safra 2017/18

Culturas puras das bactérias endofíticas foram repicadas para meio 523 e incubadas a 28 °C por 24 h. Em seguida, as células vivas foram suspensas em 20 mL de água mineral por espalhamento com alça de Drigalski. A concentração de cada suspensão de células vivas foi ajustada para OD₅₄₀ = 0,3 (10⁸ UFC/mL). Sementes de arroz das cvs. GURI INTA CL e IRGA 424RI foram desinfestadas superficialmente com álcool 70%, hipoclorito a 1% e tríplice lavagem em água destilada. As sementes foram bacterizadas por imersão (160 mL) em cada suspensão de células vivas dos isolados bacterianos e mantidas por agitação constante (shaker Tecnal, TE 420) a 150 rpm, por 12 h, a 28 °C. Para o tratamento controle, as sementes foram imersas em água mineral e submetidas às mesmas condições dos outros tratamentos. Após a bacterização das sementes, o excesso de umidade foi removido com papel toalha. Em seguida, a semeadura foi realizada em solo Gleissolo Háplico Ta distrófico típico peneirado da Estação Experimental do IRGA, em caixas plásticas (60 × 30 × 05 cm) de fundo perfurado. As caixas foram distribuídas em um viveiro sob sombrite 70 e permaneceram sob condição ambiente (25±3 °C; 70±5% de umidade). Após 31 dias, plântulas com 17 cm de altura (três a

quatro folhas) foram transplantadas para o campo. Quando do surgimento dos sintomas da brusone, a severidade foi estimada pela escala diagramática proposta por Leung et al. (1988). No caso da mancha-parda, a quantificação da severidade foi aferida pela escala diagramática proposta por Schwanck & Del Ponte (2014). Para ponderar a severidade foi aplicado o índice de McKinney (1923), pela expressão: $SEV = [\Sigma(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$, utilizando-se os dados de severidade obtidos com a escala de notas. O controle da doença promovida por cada isolado foi calculado a partir da fórmula de Abbott (1925): $C\% = (T-F)/T \times 100$, na qual: T = %severidade no controle; F = %severidade nos tratamentos; C% = percentual de controle em cada tratamento avaliado.

4.3.2.2 Bacterização de sementes e plantas pelos endofíticos na safra 2018/19

Sementes das duas cultivares foram bacterizadas, semeadas e cultivadas conforme descrito no subitem 4.3.2.1. Suspensões de células vivas ($\cong 10^8$ UFC/mL) das bactérias endofíticas foram pulverizadas por duas vezes sobre a parte aérea das plantas nos estádios fenológicos V4 e V7, primeira e segunda pulverizações, respectivamente. Paralelamente, plantas foram pulverizadas com o controle positivo trifloxistrobina + tebuconazol (1kg/ha), bem como o negativo (água). As aplicações foram realizadas por meio de pulverizador manual até o ponto de escorrimento. A quantificação da mancha-parda foi iniciada três dias após a primeira aplicação e depois a cada sete dias. A doença foi estimada de acordo com a escala diagramática proposta por Leung et al. (1988) para a mancha-parda. Para ponderar a severidade foi aplicado o índice de McKinney (1923), pela expressão: $SEV = [\Sigma (\text{grau da escala} \times \text{frequência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$, utilizando-se os dados de severidade obtidos com a escala de notas. O controle da doença de cada isolado foi calculado a partir da fórmula de Abbott (1925): $C\% = (T-F)/T \times 100$, no qual: T = %severidade no controle; F = %severidade nos tratamentos; C% = percentual de controle em cada tratamento avaliado. Não houve quantificação da brusone, pois não ocorreu severidade da doença nas plantas.

4.3.3 Extração do DNA bacteriano

A identificação das bactérias pela análise filogenética foi baseada nas sequências parciais da região 16S rDNA (Hauben et al., 1997). Cada isolado foi cultivado sobre meio 523 a 28 °C. Após 48 h de incubação, parte da cultura bacteriana, de cada isolado, foi repicada para microtubos (EppendorfTM microcentrifuge: mod. 5415C) contendo 1 mL de água esterilizada e levado ao banho seco a 100 °C por 10 minutos. Submetido à centrifugação a 5.000 rpm por três minutos à temperatura ambiente, uma alíquota de 2 µL do sobrenadante foi coletada para a PCR.

4.3.4 Amplificação do fragmento gênico 16S rDNA

A reação de PCR foi realizada com um volume final de 20 µL, contendo 0,9 µM de cada um dos oligonucleotídeos fd2 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rP1 (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') sob as condições de amplificação descritas por Weisburg et al. (1991). Os mesmos oligonucleotídeos também foram usados para o sequenciamento. A sequência completa dos genes foi obtida no programa DNA Man 4.0 (Lynnon BioSoft).

4.3.5 Correlação filogenética de 16S rDNA

As sequências recebidas foram analisadas no programa *Geneious Prime* e comparadas com as sequências presentes no banco de dados *GenBank NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências parciais da região 16S rDNA foram analisadas pelo algoritmo *Megablast* e usadas para a construção da árvore filogenética. As sequências selecionadas pelo algoritmo Clustal W (*European Bioinformatics Institute*) e as relações filogenéticas foram analisadas usando-se o método *Neighbor-Joining* (NJ), realizado pelo programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). A confiança nos clados específicos obtidos nas topologias das árvores foi testada pela análise de *bootstrap*, com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

4.3.6 Coleta dos dados meteorológicos

Dados de precipitação e de temperatura do ar foram coletados na estação meteorológica situada na Estação Experimental do Arroz, em Cachoeirinha/RS, correspondentes às safras 2017/18 e 2018/19.

4.3.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo teste F ($p < 0,05$), e, quando significativos, comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), usando o programa SigmaPlot (*software* da Systat, San Jose, CA).

4.4 Resultados

4.4.1. Biocontrole das doenças por bacterização de sementes na safra 2017/18

Para o controle da brusone na cultivar GURI INTA CL, dos 11 isolados testados, cinco reduziram significativamente a severidade em relação ao tratamento controle (Figura 1). Os índices de controle promovidos pelos isolados RS180, RS98, RS257, RS51 e RS239 foram de 9, 12, 13, 14 e 19%, respectivamente. Os isolados RS36, RS95, RS127, RS269, RS307 e RS343 não controlaram a doença, quando comparados ao controle.

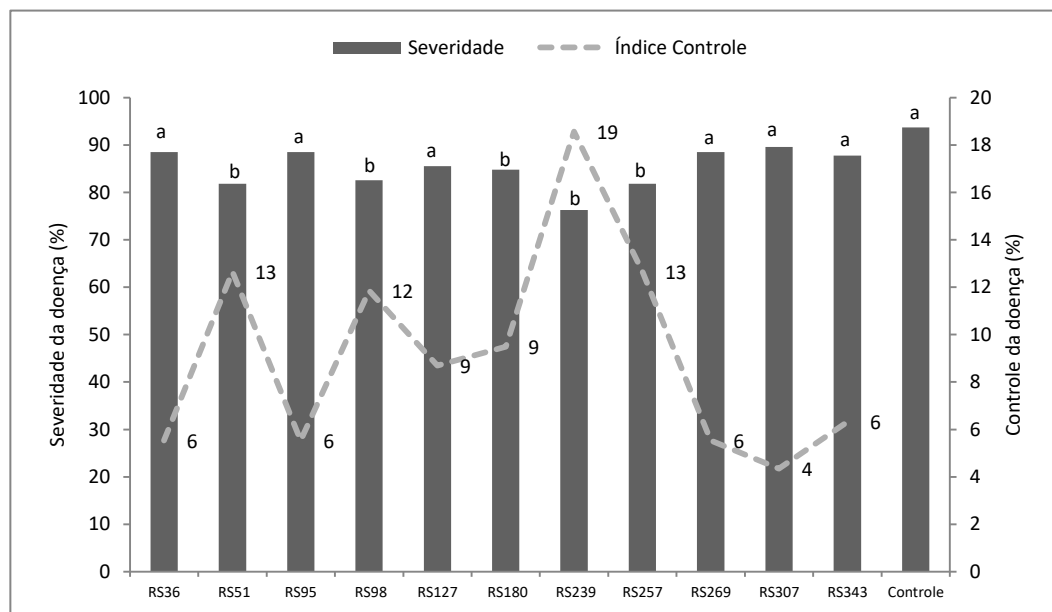


Figura 1. Severidade e controle da brusone, causada por *Magnaporthe oryzae* sobre plantas de arroz da cv. GURI INTA CL oriundas de sementes tratadas com os isolados RS36, RS51, RS95, RS98, RS127, RS180, RS239, RS257, RS269, RS307, RS343 e controle (água) na safra 2017/18. Cachoeirinha-RS. As colunas representam as médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

No tocante ao controle da mancha-parda promovido pelos endofíticos em plantas de arroz cv. IRGA 424 RI, proveniente de sementes bacterizadas, a aplicação do isolado RS127 reduziu a severidade da doença, com índice de controle de 27% quando comparado com ao controle (Figura 2).

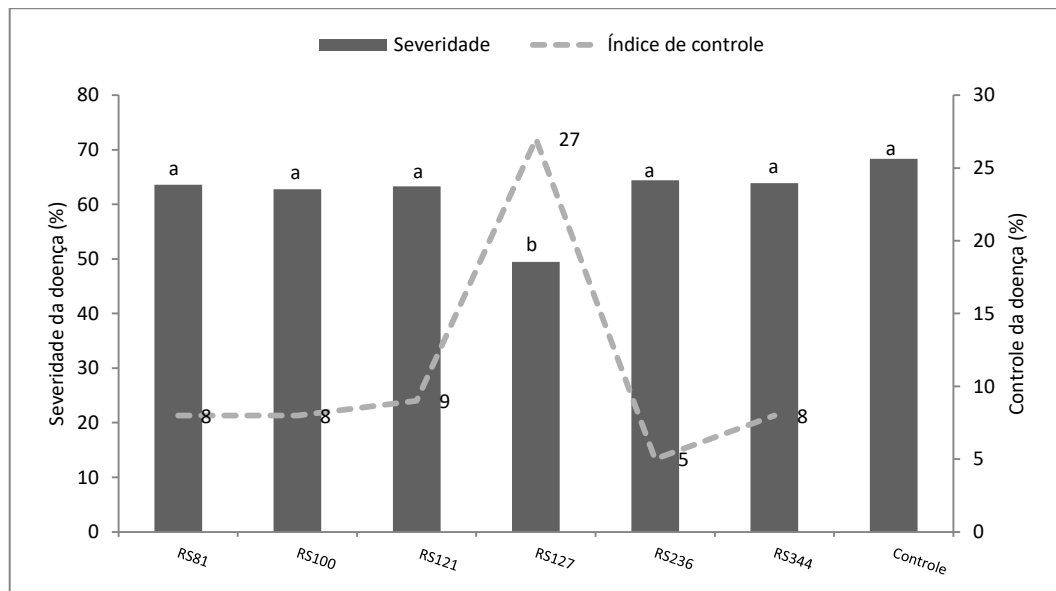


Figura 2. Severidade e controle da mancha-parda, causada por *Cochliobolus miyabeanus*, sobre plantas de arroz da cv. IRGA 424 RI oriundas de sementes tratadas com os isolados RS81, RS100, RS121, RS127, RS236, RS344 e controle (água) na safra 2017/18. Cachoeirinha-RS. As colunas representam as médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.4.2. Biocontrole da mancha-parda por bacterização de sementes e plantas na safra 2018/19

Plantas de arroz da cv. GURI INTA CL não apresentaram sintomas de brusone na safra 2018/19, por não ter havido condições de temperatura e umidades adequadas (Fig. 5b) para o sucesso da infecção do patógeno. Dessa forma, não foram obtidos os resultados do emprego dos métodos de bacterização em sementes e plantas contra o patógeno supracitado. Para o controle da mancha-parda sobre a cv. IRGA 424 RI, os isolados endofíticos RS344, RS236, RS121 e RS127 controlaram a doença em 13, 15, 16 e 17%, respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 3). Estes isolados apresentaram redução da severidade da doença equivalente ao tratamento químico com trifloxistrobina + tebuconazol, não diferindo estatisticamente.

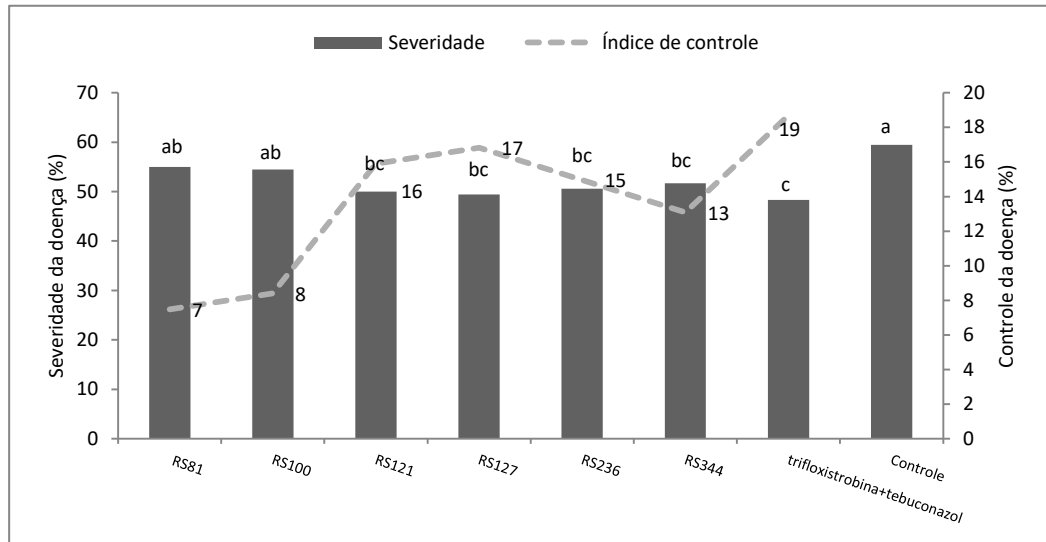


Figura 3. Severidade e controle da mancha-parda, causada por *Cochliobolus miyabeanus*, sobre plantas de arroz da cv. IRGA 424 RI oriundas de sementes tratadas e pulverizadas com os isolados RS81, RS100, RS121, RS127, RS236 e RS344, trifloxistrobina + tebuconazol e água (controle) na safra 2018/19. Cachoeirinha-RS. As colunas representam as médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.4.3. Identificação dos isolados endofíticos

Os dados obtidos após a comparação das sequências no banco de dados GenBank estão representados na Tabela 01.

Tabela 01. Identificação das bactérias endofíticas isoladas de plantas de arroz, por comparação das sequências no banco de dados GenBank.

Isolado	Identidade bacteriana	Similaridade (%)	Código de acesso
RS36	<i>Pseudomonas</i> sp.	99,77	NR_118125.1
RS51	<i>Staphylococcus</i> sp.	94,91	NR_074999.2
RS81	<i>Providencia</i> sp.	99,64	NR_115879.1
RS95	<i>Bacillus safensis</i>	99,63	NR_113945.1
RS98	<i>Providencia</i> sp.	99,81	NR_115879.1
RS100	<i>Pseudomonas monteilii</i>	100	NR_024910.1
RS121	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	100	NR_024709.1
RS127	<i>Enterobacter</i> sp.	97,26	NR_146667.2
RS180	<i>Enterobacter asburiae</i>	99,15	NR_145647.1
RS236	<i>Pseudomonas</i> sp.	97,48	NR_118125.1
RS239	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	NR_118125.1
RS257	<i>Enterobacter tabaci</i>	98,98	NR_146667.2
RS269	<i>Pseudomonas</i> sp.	99,49	NR_113583.1
RS307	<i>Bacillus</i> sp.	99,83	NR_148244.1
RS343	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99,83	NR_148818.1
RS344	<i>Fictibacillus</i> sp.	100	NR_159291.1

A partir da sequência do gene 16S do rDNA foi construída a árvore filogenética

utilizando-se as cepas identificadas, pelo método do vizinho mais próximo (Figura 4). A identificação das bactérias mostrou a presença de sete gêneros diferentes. Os resultados da análise filogenética mostraram um grande grupo com cinco cepas de *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. RS36; *Pseudomonas monteilii* RS100; *Pseudomonas* sp. RS269; *Pseudomonas* sp. RS236 e *Pseudomonas* sp. RS239) agrupados como cluster 4 e as cepas de *Bacillus* (RS95 e RS307) como cluster 2 (Figura 4). A árvore filogenética demonstra que algumas cepas identificadas ficaram em ramos bem suportados com *bootstrap* superior a 70%.

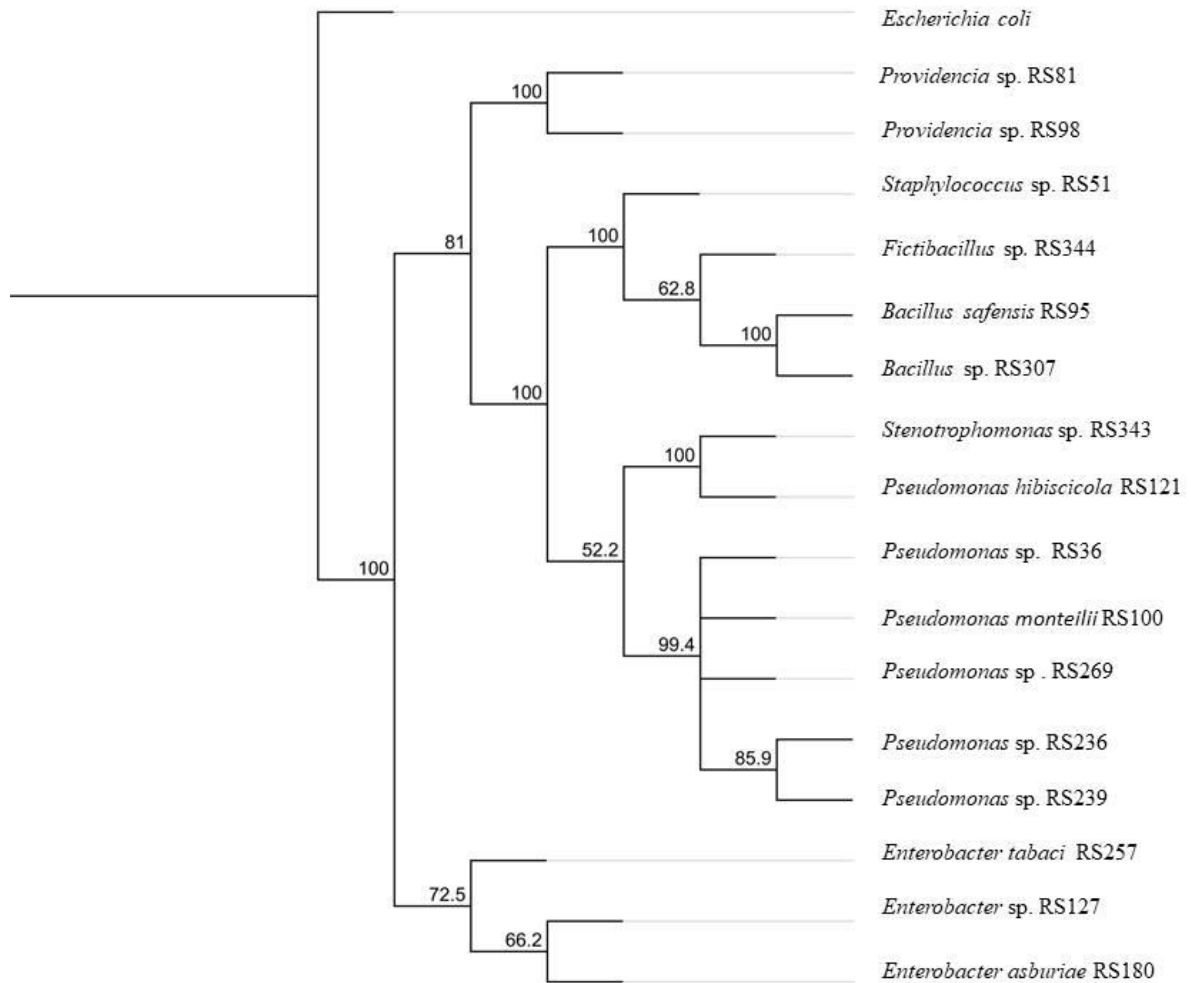


Figura 4. Árvore filogenética baseada na análise de sequência parcial de genes 16S rDNA, mostrando o agrupamento das bactérias endofíticas isoladas de arroz obtidas no GenBank. A árvore foi gerada aplicando o método vizinho mais próximo (*software* MEGA; Tamura et al., 2007). Os números nos nós indicam valores de *bootstrap* em porcentagem (1000 *bootstraps*). *Escherichia coli* foi usada como um *out-group*.

4.4.4. Análise meteorológica

As figuras 5a e b apresentam dados relativos à temperatura do ar e à precipitação pluvial vigentes durante a realização dos experimentos com sementes de arroz bacterizadas e/ou pulverizadas com suspensões bacterianas endofíticas para controle da brusone e mancha-

parda. Na safra 2017/18, as temperaturas foram mais amenas do que em 2018/19, com valores entre 25 a 28°C. Tanto a umidade relativa do ar quanto a precipitação pluvial foram mais elevadas na safra 2017/18, quando comparadas com as ocorridas na safra 2018/19.

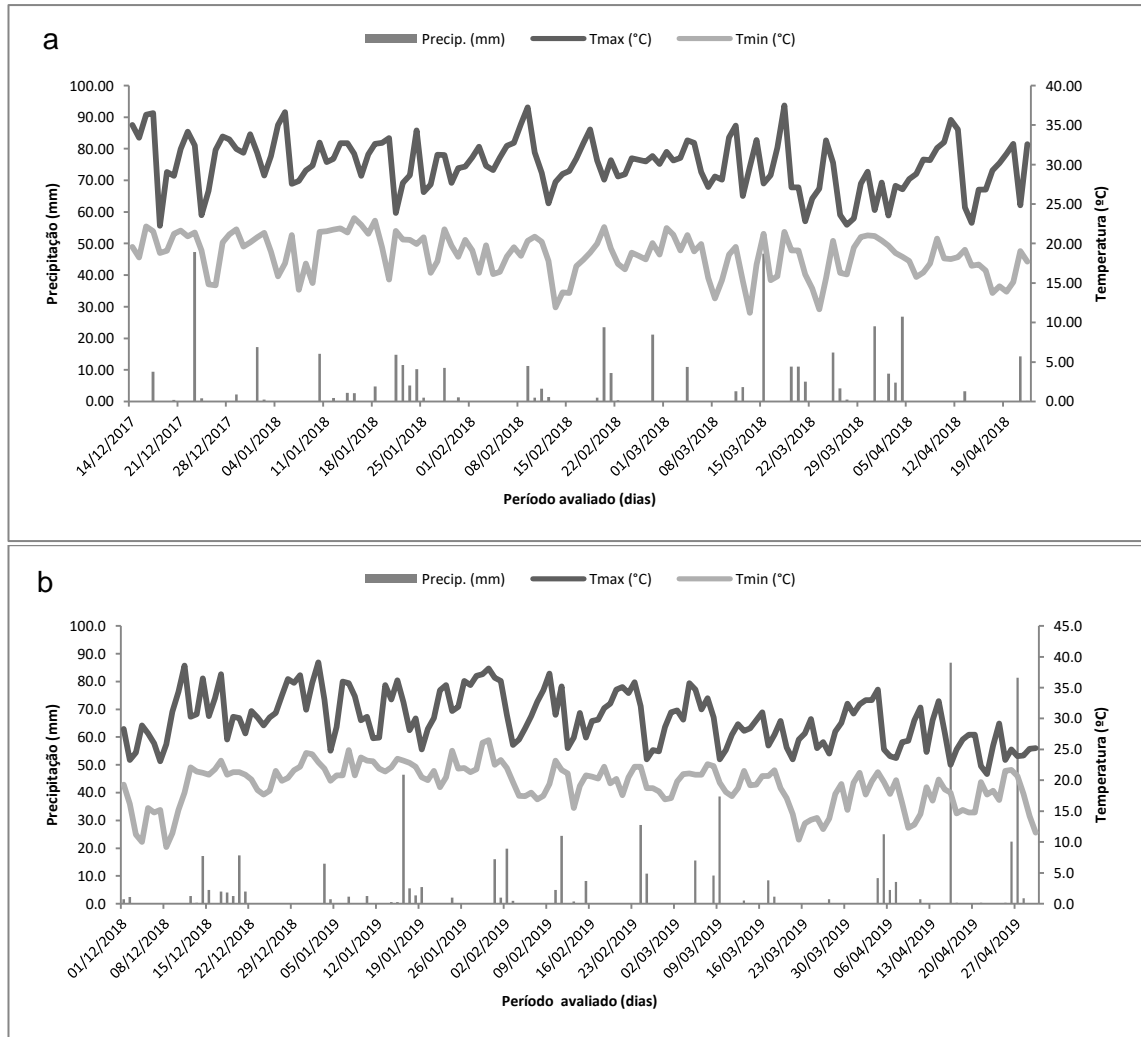


Figura 5. Dados das temperaturas máxima e mínima do ar e da precipitação pluvial durante a realização dos experimentos a campo, para os ensaios conduzidos na Estação Experimental do Arroz, em Cachoeirinha/RS, nas safras 2017/18 (a) e 2018/19 (b).

4.5. Discussão

Signatário do acordo internacional para a produção de alimentos mais saudáveis (Glick, 2014), o Brasil tem estimulado pesquisas que resultem em práticas agrícolas com o menor uso de agrotóxicos e impactos ao meio ambiente (Spence et al., 2014b; Mao et al., 2019). Dessa forma, o controle biológico com bactérias benéficas tem ganhado popularidade como uma estratégia confiável no manejo integrado de doenças reduzindo o emprego de agrotóxicos às culturas (Spence et al., 2014b; Ramli et al., 2016; Lanna-Filho et al., 2017; Mao et al., 2019).

Estudos explorando o biocontrole por bactérias endofíticas têm ganhado notoriedade em condições controladas (Li et al., 2011; Spence et al., 2014b), mas os efeitos no campo ainda carecem de estudos. Neste estudo, foi evidenciado que poucos isolados apresentaram efeitos positivos a campo contra duas doenças importantes da cultura do arroz, em comparação com o universo inicial de 303 isolados obtidos em estudos anteriores (Pozzebon, 2015). Isto corrobora com os estudos de outros autores (Chen et al., 1996; Nejad et al., 2014), que provaram serem poucos os isolados eficientes em condições de campo.

Notadamente, em exposição às adversidades climáticas e antagônicas da microbiota natural, as bactérias muitas vezes não conseguem se estabelecer no hospedeiro (Ren et al., 2015; Edwards et al., 2015). Outro fator relevante pode estar relacionado à compatibilidade genética entre bactéria-hospedeiro (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Shen & Fulthorpe, 2015; Ding & Melcher, 2016). Estudos têm demonstrado que bactérias benéficas podem ter maior afinidade por certas cultivares em relação a outros (Marques et al., 2015; Rodriguez-Blanco et al., 2015). Normalmente em decorrência de fatores de reconhecimento bactéria-planta (Schulz & Boyle, 2005; Ryan et al., 2008; Porrás-Alfaro & Bayman, 2011; Suryanarayanan et al., 2011), que tornam a associação benéfica para ambos. Embora os agentes endofíticos deste estudo sejam autóctones de plantas de arroz, o insucesso de alguns isolados no controle das doenças a campo pode estar relacionado aos fatores supramencionados. Todavia, estudos futuros devem ser realizados a fim de averiguar quais dos fatores atuaram negativamente sobre os isolados testados.

Plantas oriundas de sementes bacterizadas que apresentaram maior controle, podem ter se beneficiado das endofíticas por estarem em ‘estado de indução’ (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Yi et al., 2013; Sarma et al., 2014; Lanna-Filho et al., 2017; Pelaez & Londoño, 2017). Embora, bactérias endofíticas possam se translocar dentro do hospedeiro, a população bacteriana seria irrelevante em sítios alvos dos patógenos da parte aérea (Silva et al., 2008; Senthilkumar et al., 2009; Compant et al., 2010; Ludwig et al., 2013). Corroborando

com estes dados, Ludwig et al. (2009) avaliaram o potencial de *P. synxantha*, *P. flurescens*, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* e *Stenotrophomonas maltophilia* para o controle da mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) e da escaldadura (*Gerlachia oryzae*) do arroz pela bacterização de sementes. Para mancha-parda, o melhor desempenho foi proporcionado pelos isolados *P. synxantha* e *P. flurescens*, que apresentaram 80 e 86% de redução da severidade, respectivamente. Certamente, as bactérias estimularam a ocorrência do fenômeno de indução de resistência no hospedeiro, salvaguardando os tecidos alvo dos patógenos (Amorim & Pascholati, 2018).

Com relação à bacterização de sementes e pulverização das plantas, a menor severidade da mancha-parda na cv. IRGA 424 RI ocorreu em associação com os isolados RS344, RS236, TS121 e RS127. Este último, o qual também reduziu a doença com somente a bacterização das sementes, pode também estar relacionado ao fenômeno de indução de resistência. Corroborando com esta suposição, Lanna-Filho et al. (2013b) mostraram que as espécies de *Bacillus* foram capazes de se adaptar e sobreviver no filoplano de tomate, ocupando locais específicos que seriam colonizados pelo patógeno. Da mesma forma, outro trabalho de Lanna-Filho et al. (2013a) mostrou que as endofíticas também reduziram em até 63% a severidade da mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria*. Os mesmos autores relataram que os bacilos também estimulavam as respostas de defesa das plantas contra o patógeno, quando pulverizado na superfície da folha.

O experimento com as plantas da cv. GURI INTA CL utilizando os dois métodos de aplicação das endofíticas não manifestou sintomas da brusone, embora houvesse grande pressão de inóculo na área cultivada. Certamente as condições meteorológicas não foram satisfatórias para o sucesso da infecção do patógeno (Dario et al, 2005). Para ocorrência dessa doença é primordial uma temperatura constante de 28 °C, associada a uma umidade superior a 90%. As condições inadequadas ficam evidentes quando são comparadas as nuances das condições de temperatura e precipitação nas duas safras de cultivo (Figuras 5a e b). Outros

autores também reportaram a interferência dos fatores meteorológicos para a manifestação da doença no campo (Piotti et al., 2005; Nunes et al., 2018), estimulando a menor ou maior severidade da doença.

A identidade das bactérias endofíticas em arroz foi realizada por alguns autores (Sun et al., 2008; Ferrando et al., 2012; Chung et al., 2015), que demonstraram haver uma ampla diversidade desses microrganismos. Neste estudo, dois gêneros se destacam pela ampla utilização como controladoras de doenças de plantas, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Karimi et al., 2012; Lateef & Gueguim-Kana, 2015; Sangiogo et al., 2018). Estes dois gêneros também abrigam espécies indutoras de resistência (Akram et al., 2015; Planchamp et al., 2015) e produtoras de metabólitos nocivos aos patógenos (Ariza & Sanchez, 2015; Amaro et al., 2018). O gênero *Pseudomonas* é considerado promissor no controle de doenças de plantas, pois criam uma zona de proteção em torno das sementes, atuando como promotor de crescimento, possivelmente pelos mecanismos de indução de resistência e antibiose (Sharma et al., 2014). Em se tratando do gênero *Bacillus*, as bactérias possuem características promotoras do crescimento e também têm promissoras aplicações biotecnológicas devido à sua capacidade de produzir várias enzimas e metabólitos secundários industrialmente aplicáveis (Roh et al., 2007; Francis et al., 2010; Lateef et al., 2015).

Considerando que o uso de produtos biológicos é uma ferramenta para compor as práticas empregadas no manejo integrado de doenças no cenário atual do agronegócio brasileiro, é fundamental atender às exigências do marco regulatório (conjunto de leis, decretos e normativas que regulam o funcionamento de determinado setor), no que se refere à regulamentação da produção e ao uso desses produtos (Paula Junior et al., 2013). Neste sentido, algumas das espécies identificadas nesse estudo da família *Enterobacteriaceae* não poderiam ser utilizadas como bioproduto. Embora muitas cepas apresentem bom desempenho em ensaios específicos, isso muitas vezes não se traduz em um biocontrole consistente e eficaz em diversas situações de campo. De forma geral, o biocontrole utilizando bactérias

endofíticas pode ser uma estratégia adicional no manejo de mancha-parda e brusone, podendo reduzir o uso intensivo de fungicidas. Entretanto, o emprego de bactérias endofíticas no controle de doenças depende do sucesso do binômio endofítica-planta, pois agentes bióticos e abióticos podem reduzir a eficiência do controle, inviabilizando sua utilização (Lanna-Filho, 2011).

4.6. Considerações Finais

Pode-se concluir que dos 11 isolados testados para o controle da brusone, cinco reduziram a severidade da doença quando comparado ao controle. Entretanto, devido às características patogênicas de algumas espécies identificadas, somente a cepa *Pseudomonas* sp. RS239 apresenta potencial para utilização.

Para a mancha-parda, dos seis isolados testados, quatro reduziram a severidade da doença em relação ao controle. No entanto, a cepa com maior potencial, *Enterobacter* sp. RS127, não apresenta características desejáveis para a idealização de um bioproduto, devido ao caráter patogênico ao homem. Dessa forma, apresenta potencial para utilização no controle da mancha-parda, *Pseudomonas manteilii* RS100, *Pseudomonas* sp. RS236 e *Fictibacillus* sp. RS344.

4.7. Referências

- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- Abdelrahman M, Abdel-Motaal F, El-Sayed M, Jogaiah S, Shigyo M, Ito S I, Tran LSP (2016) Dissection of *Trichoderma longibrachiatum* induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. cepa by target metabolite profiling. *Plant Science* 246:128-138.
- Akram W, Anjum T, Ali B. (2015) Searching ISR determinant/s from *Bacillus subtilis* IAGS174 against *Fusarium* wilt of tomato. *BioControl* 60(2):271-280.
- Amaro JKC, Vieira BS, Sousa LA (2018) Biological control of *Colletotrichum gloeosporioides* in pepper with isolates of *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Agriculture* 93(2):195-209.
- Amorim L, Pascholati SF (2018) Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: Amorim L, Rezende AM, Bergamin Filho A. *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 5ed. Ouro Fino MG: Agronômica Ceres, 2018. 573 pg.
- Ariza Y, Sánchez L. (2015) Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova Publicación en Ciências Biomédicas* 10(18):149-155.
- Arruda L, Beneduzi A, Martins A, Lisboa B, Lopes C, Bertolo F, Passaglia LMP, Vargas LK (2013) Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied of Soil Ecology* 63:15-22.
- Ashkani S, Rafii MY, Shabanimofrad M, Miah G, Sahebi M, Azizi P, Tanweer FA, Akhtar MS, Nasehi A (2015) Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of blast disease resistance in rice crop. *Frontiers in plant Science* 6(886):1-14.
- Back AJ, Deschamps FC, Santos MGS (2016) Ocorrência de agrotóxicos em águas usadas com irrigação de arroz no sul de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais* 39:47-58.
- Bonman JM, Khush GS, Nelson RJ (1992) Breeding rice for resistance to pests. *Annual review of Phytopathology* 30(1):507-528.
- Celmer A, Madalosso MG, Debortoli MP, Navarini L, Balardin RS (2007) Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42:901-904.
- Chen Y, Mei R, Lu S, Liu L, Kloepper JW (1996) The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: Utkhede RS, Gupta, VK (eds.). *Management of Soil Borne Diseases*, Kalyani Publishers, New Delhi, 165-184.
- Chung EJ, Hossain MT, Khan A, Kim KH, Jeon CO, Chung YR (2015) *Bacillus oryzae* sp. nov., an Endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, Plant Growth Promoting, and Systemic Resistance Inducing Activities in Rice. *Plant Pathology Journal* 31(2):152-164.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42(5):669-678.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Safra 2018/19 - N. 6 - Sexto levantamento

Março 2019. Disponível em: https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/24952_cd2f531372c01a06d768793ce5f6cab2 Acesso em: 25 março de 2019

Dario GJA, Martin TN, Dourado Neto D, Manfron PA, Bonnacarrère RAG, Crespo PEN (2005) Influência do uso de fitorregulador no crescimento da soja. Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia 12:63-70.

Dias Neto, JJ, Santos GR, Anjos LM, Rangel PHN, Ferreira ME (2010) Hot spots for diversity of *Magnaporthe oryzae* physiological races in irrigated rice fields in Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45(3):252-260.

Ding T, Melcher U (2016) Influences of Plant Species, Season and Location on Leaf Endophytic Bacterial Communities of Non-Cultivated Plants. PLoS ONE 11(3):1-13.

Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiome of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences 112: E911-E920.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. 412 p.

Faltin F, Lottmann J, Grosch R, Berg G. (2004) Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kühn. Canadian journal of microbiology 50:811-820.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39(4):783-791.

Ferrando L, Mañay JF, Scavino AF (2012) Molecular and culture-dependent analyses revealed similarities in the endophytic bacterial community composition of leaves from three rice (*Oryza sativa*) varieties. FEMS Microbiology Ecology 80(3):696-708.

Francis I, Holsters M, Vereecke D (2010) The Grampositive side of plant–microbe interactions. Environmental Microbiology 12:1-12.

Gasparini MF, Vieira PFA (2010) (In) visibilidade social da poluição por agrotóxicos nas práticas de rizicultura irrigada: síntese de um estudo de percepção de risco em comunidades sediadas na zona costeira de Santa Catarina. Desenvolvimento e Meio Ambiente 21:115-127.

Glick, BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169(1):30-9.

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43(10): 895-914.

Hauben L, Vauterin L, Swings J, Moore RB (1997) Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 47(2): 328-335.

INMET - instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/Andgt>. Acesso em 15 de julho de 2019.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60: 969-979.

Karimi K, Amini J, Harighi B, Bahramnejad B (2012) Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. Against *Fusarium* wilt of chickpea. Australian Journal of Crop Science 6(4):695-703.

- Kiraly Z et al. (1970) *Methods in plant pathology*. Budapest: Akademiai Kiadó. 509 p.
- Lanna-Filho R (2011) Controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* GFP-marcada) bacteriana do tomateiro por isolados endofíticos de *Bacillus* sp. 2011. 108 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Lanna-Filho R, Souza R, Magalhães M, Villela L, Zanotto E, Ribeiro-Júnior P, Resende MLV (2013a) Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. *Tropical Plant Pathology* 38:295-302.
- Lanna-Filho R, Souza RM, Alvez, E (2017) Induced resistance in tomato plants promoted by two endophytic bacilli against bacterial speck. *Tropical plant pathology* 42: 96-108.
- Lanna-Filho R, Souza RM, Ferreira A, Quecine MC, Alves E, Azevedo JL (2013b) Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. *Australasian Plant Pathology* 42:643-651.
- Lateef AA, Gueguim-Kana IB (2015) The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia* 70:411-419.
- Lelliott RAA, Stead DE (1987) *Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease* 216.
- Leung H, Borromeo ES, Bernardo MA, Notteghem JL (1988) Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe griseae*. *The American Phytopathological Society* 78(9):1227-1233.
- Li Q, Jiang Y, Ning P, Zheng L, Huang J, Li G, Hsiang T (2011) Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biological Control* 58(2):139-148.
- Lucas JA, Ramos SB, Montes F, Ojeda J, Megias M, Gutierrez Mañero FJ (2009) Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Research* 114(3):404-410.
- Ludwig J, Moura AB, Gomes, CB (2013) Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. *Tropical Plant Pathology* 38(3):264-268.
- Ludwig J, Moura AB, Santos AS, Ribeiro AS (2009) Microbiolização de sementes para o controle da mancha parda e da escaudadura em arroz irrigado. *Tropical Plant Pathology* 34(5):322-328.
- Marques JM, Silva TF, Vollu RE, Blank AF, Ding GC, Seldin L, Smalla K (2015) Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage. *Applied Soil Ecology* 96:273-281.
- Martini LB, Ethur LZ, Dorneles KR (2014) Influência de metabólitos decendários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de Arroz. *Ciência e Natura* 36(2):86-91.
- Mascarin GB, Lopes RB, Delalibera I, Fernandes EKK, Luz C, Faria M (2019) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 165:46-53.
- Mckinney HH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26:195-218.

- Monnerat R, Praça LB, Silva EYY, Montalvão S, Martins E, Soares CM, Queiroz PR (2018) Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 2018. 34 pp.
- Nejad MS, Bonjar GHS, Dehkaei FP (2014) Control of *Bipolaris oryzae* the causal agent of rice brown spot disease via soil *Streptomyces* sp. isolate G. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 2:310-317.
- Nunes CDM, Martins JFS, Azambuja IHV, Pazini JB (2018) Efeito da Época e Número de Aplicações de Fungicidas no Controle de Brusone e Rentabilidade do Arroz Irrigado na Região Sul do Rio Grande do Sul. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 11p.
- Paula Júnior TJ, Venzon M, Teixeira H, Bettiol W, Morandi, MAB, Vilella FMF, Castro MLMP (2013) Regulamentação e uso de produtos à base de agentes biológicos para o controle de doenças de plantas e pragas no Brasil. Informe Agropecuário 34(276):50-57.
- Pelaez MJ, Londoño SXV (2017) Resistencia inducida a la enfermedad del añublo de la panícula del arroz inoculando bacterias endofíticas. Revista de Investigación Agraria y Ambiental 8(2):51-59.
- Piotti E, Rigano MM, Rodino D, Rodolfi M, Castiglione S, Picco AM and Sala F (2005) Genetic structure of *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. isolates from Italian paddy fields. Journal of Phytopathology 153:80-86.
- Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B (2015) Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. Frontiers in plant science 5(719):1-10.
- Porras-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. Annual Review of Phytopathology 49(7):291-315.
- Pozzebon BC (2015) Promoção de crescimento e biocontrole da mancha-parda por bactérias endofíticas de arroz. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Prabhu AS, Fillipi MC (2006) Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 387p.
- Ramli NR, Mohamed MS, Seman IA, Zairun MA, Mohamad N (2016) The potential of endophytic bacteria as a biological control agent for organoderma disease in oil palm. Sains Malays 45:401-409
- Ren G, Zhang H, Lin X, Zhu J, Jia Z (2015) Response of leaf endophytic bacterial community to elevated CO₂ at different growth stages of rice plant. Frontiers in Microbiology 6:855.
- Rodriguez-Blanco A, Sicardi M, Frioni L (2015). Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). Biology and Fertility of Soils 51:391-402.
- Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH (2007) *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. Journal of Microbiology and Biotechnology 17:547-559.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. MPMI 19(8):827-837.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters 278:1-9.

- Sangiogo M, Rodriguez DP, Moccellini R, Bermudez JMM, Corrêa BO, Moura AB (2018) Foliar spraying with bacterial biocontrol agents for the control of common bacterial blight of bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 53(10):1101-1108.
- Santos CC, Oliveira FA, Santos MS, Talamini V, Ferreira JMS, Santos FJ (2012) Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. *Scientia Plena* 8(4):1-5.
- Santos GR, Saboya LMF, Rangel PHN, Oliveira-Filho JC (2002) Resistência de genótipos de arroz a doenças no sul do Estado do Tocantins. *Bioscience Journal* 18:3-12.
- Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* 109(6):661-686.
- Schwanck AA, Del Ponte EM (2014) Accuracy and Reliability of Severity Estimates Using Linear or Logarithmic Disease Diagram Sets in True Colour or Black and White: a Study Case for Rice Brown Spot. *Journal of Phytopathology* 162:670-682.
- Semensatto S (2019) Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. *Revista Eletrônica Científica da UERGS*, v. xx, n. x, p. xx-xx, 2019.
- Senthilkumar M, Swarnalakshmi K, Govindasamy V, Lee YK, Annapurna K (2009) Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. *Current Microbiology* 58:288-293.
- Sharma PK, Fu J, Zhang X, Fristensky B, Sparling R, Levin DB (2014) Genome features of *Pseudomonas putida* LS46, a novel polyhydroxyalkanoate producer and its comparison with other *P. putida* strains. *AMB Express* 4(37):1-18.
- Sharma RK, Gogoi A, Dehury B, Debnath R, Bora TC, Saikia R (2014) Community profiling of culturable fluorescent *Pseudomonas* in the Rhizosphere of Green Gram (*Vigna radiate* L.). *PLoS ONE* 9(10):1-14
- Shen SY, Fulthorpe R (2015) Seasonal variation of bacterial endophytes in urban trees. *Frontiers in Microbiology* 6:427.
- Silva DRO, Avila LA, Agostinetto D, Bundt ADC, Primel EG, Caldas SS (2011) Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. *Química Nova* 34(5):748-752.
- Silva HSA, Terrasan CRF, Tozzi JPL, Mello IS, Bettiol W (2008) Bactérias endofíticas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). *Tropical Plant Pathology*, Lavras 33(1):049-054.ca
- Skamnioti P, Gurr SJ (2009) Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. *Trends Biotechnology* 27:141-150.
- SOSBAI - Sociedade Sul Brasileira do Arroz Irrigado. Arroz Irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. XXXIII Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado. Gramado, RS: SOSBAI, 2018. 197p.
- Spence C, Alff E, Johnson C, Ramos C, Donofrio N, Sundaresan V, Bais H (2014b) Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology* 14(130):1-17.
- Spence CA, Raman V, Donofrio NM, Bais H (2014a) Global gene expression in rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae* treated with a natural rice soil isolate. *Planta* 239:171-185.
- Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W (2008) Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbiology*

Ecology 55:415-424.

Sunder SP, Singh R, Agarwal R (2014) Brown spot of rice: an overview. *Indian Phytopathology* 67(3):201-215.

Suryanarayanan TS, Murali TS, Thirunavukkarasu N, RajuluMG, Venkatesan G, Sukumar R (2011) Endophytic fungal communities in woodyperennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodiversity and Conservation* 20(5): 913-928.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) softwareversion 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.

Tjamos E C, Tsitsigiannis DI, Tjamos S E, Antoniou PP, Katinakis P. (2004). Selection and Screening of Endorhizosphere Bacteria from Solarized Soils as Biocontrol Agents Against *Verticillium dahliae* of Solanaceous Hosts. *European Journal of Plant Pathology* 110:35-44.

Tuite J (1969) *Plant pathological methods*. Minneapolis: Burgess. 239 p.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703.

Yi HS, Yang JW, Ryu CM (2013) ISR meets SAR out side: additiveaction ofthe endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemicalinducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterialspot infield-grown pepper. *Front Plant Science* 4:1-11.

Zarandi ME, Bonjar GS, Dehkaei FP, Moosavi SA, Farokhi PR, Aghighi S (2009) Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. *American Journal of Applied Sciences* 6(1):194-199.

Zeigler RS, Sally AL, Paul ST (1994) Rice blast disease. *Int. Rice Res. Inst.*, 636p.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste estudo, foi possível determinar quais bactérias endofíticas podem apresentar sucesso no controle da brusone e da mancha-parda no campo. Porém, novos ensaios deverão ser realizados no campo a fim de confirmar a ação antagonística das cepas mais promissoras. Adicionalmente, novas análises moleculares devem ser realizadas com o uso de *primers* específicos para determinar as principais espécies promissoras no controle das enfermidades. Somente assim, será possível avançar em outros estudos para a idealização de um bioformulado.

Muito diferente dos estudos realizados em condições controladas, em campo o comportamento dos agentes endofíticos pode ser alterado por haver uma maior condição de estresse. Nesta circunstância, as células vegetativas podem despende um custo energético para sobreviver, ao invés de exercer as suas atividades benéficas à planta. Isto pode ocasionar a redução ou estagnação do crescimento das bactérias no campo, causando o insucesso da expressão dos mecanismos de biocontrole. A instabilidade desses micro-organismos em condições naturais de plantio é o principal obstáculo para o sucesso dos produtos à base de bactérias. Por isto, a repetibilidade dos estudos a campo e em regiões geográficas distintas é de suma importância para atestar a efetividade das bactérias postas à prova. Desta forma, é mister realizar pelo menos mais dois experimentos no campo com as cepas testadas neste estudo. Para depois testar em outras regiões geográficas que apresentem diferenças edafoclimáticas e, avançar na elaboração de um bioproduto.